



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par L'UNIVERSITE PAUL SABATIER - TOULOUSE III
Discipline ou spécialité : CHIMIE MACROMOLECULAIRE ET SUPRAMOLECULAIRE

Présentée et soutenue par Yiqian WEI
Le 21 septembre 2009

Titre : DESIGN DE DENDRIMERES FLUORESCENTS POUR L'IMAGERIE

JURY

M.	M. DESTARAC, Professeur à l'Université Paul Sabatier, Toulouse	Président
Mme	L. PENG, Directeur de recherche au C.N.R.S., Marseille	Rapporteur
M.	B. DONNIO, Chargé de Recherche au C.N.R.S., habilité, Strasbourg	Rapporteur
Mme	R. NUNEZ AGUILERA, Tenure scientist, habilitée, Barcelona	Examinatrice
Mlle	A.-M. CAMINADE, Directeur de recherche au C.N.R.S., Toulouse	
M.	J.-P. MAJORAL, Directeur de recherche émérite au C.N.R.S., Toulouse	

Ecole doctorale : ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA MATIERE
Unité de recherche : Laboratoire de Chimie de Coordination
Directeur(s) de Thèse : Anne-Marie Caminade & Jean-Pierre Majoral

THESE

présentée devant

L'UNIVERSITE PAUL SABATIER – TOULOUSE III
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA MATIERE

en vue de l'obtention du

DOCTORAT D'UNIVERSITE

Spécialité : CHIMIE MACROMOLECULAIRE ET SUPRAMOLECULAIRE

Yiqian WEI

Ingénieur INSA Toulouse

DESIGN DE DENDRIMERES FLUORESCENTS POUR L'IMAGERIE

Directeurs de thèse : Jean-Pierre Majoral
Anne-Marie Caminade

Soutenue le 21 septembre 2009 devant la commission d'examen :

M.	M. DESTARAC, Professeur à l'Université Paul Sabatier, Toulouse	Président
Mme	L. PENG, Directeur de recherche au C.N.R.S., Marseille	Rapporteur
M.	B. DONNIO, Chargé de Recherche au C.N.R.S., habilité, Strasbourg	Rapporteur
Mme	R. NUNEZ AGUILERA, Tenure scientist, habilitée, Barcelona	Examinatrice
Mlle	A.-M. CAMINADE, Directeur de recherche au C.N.R.S., Toulouse	
M.	J.-P. MAJORAL, Directeur de recherche émérite au C.N.R.S., Toulouse	

*Recherches effectuées au Laboratoire de Chimie de Coordination
205, route de Narbonne, 31077 TOULOUSE cedex 4*



Remerciements

Avant de débiter, je souhaite remercier Madame Peng, Monsieur Donnio d'avoir accepté de juger ce travail, Madame Nunez Aguilera pour sa participation au jury et Monsieur le Professeur Destarac d'avoir présidé le jury de soutenance.

Grâce à la direction successive de Messieurs Bonnet et Chaudret à la tête du Laboratoire de Chimie de Coordination, j'ai pu y effectuer agréablement ces travaux de thèse et je les en remercie.

Je tiens particulièrement à remercier Mademoiselle Caminade et Monsieur Majoral de m'avoir accueillie dans leur équipe et de m'avoir soutenue dans toutes mes démarches scientifiques.

Comment ne pas penser aux services communs du laboratoire et en particulier au service RMN. Notamment, un grand merci à Monsieur Coppel pour son expertise en expériences de diffusion en RMN et pour ses réflexions scientifiques.

Ce projet ayant été réalisé en collaboration avec plusieurs équipes, je voudrais également remercier Madame Golzio, Messieurs Teissié et Joly de l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale pour tous les résultats concernant l'aspect biologique. J'associe à ces remerciements Madame Blanchard-Desce du Laboratoire de Synthèse et Electrosynthèse Organique pour toutes les caractérisations photophysiques des nanodots organiques.

Remerciements groupés pour tous les membres de l'équipe M, tous ceux qui m'ont aidée, avec qui j'ai partagé de bons moments lors de ces trois années de thèse et qui ont rendu cette aventure autant humaine que scientifique.

Et enfin, pour ceux qui ont toujours su me soutenir dans mes moments d'interrogations perfectionnistes, à mes parents et à mon mari : un gros lot de remerciements.

Table des matières

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Chapitre 1 Les dendrimères : Généralités et cas particuliers des dendrimères fluorescents en biologie.....	3
---	----------

1.1 Dendrimères	6
------------------------	----------

1.1.1 Historique.....	6
1.1.2 Structure générale d'un dendrimère.....	7
1.1.3 Méthodes de synthèse des dendrimères " traditionnels "	8
1.1.4 Dendrimères acides nucléiques.....	15
1.1.5 Dendrimères contenant des hétéroatomes	16
1.1.6 Dendrimères : excellents candidats pour des applications en biologie.....	20
1.1.6.1 Propriétés intrinsèques du dendrimère	21
1.1.6.2 Propriétés physicochimiques	22
1.1.6.3 Capacité à interagir avec des systèmes biologiques	24
1.1.6.4 Biocompatibilité.....	25

1.2 Dendrimères fluorescents et leurs applications en biologie	27
---	-----------

1.2.1 Dendrimères poly(amidoamine)-PAMAM comme plateforme	29
1.2.1.1 Internalisation et localisation intracellulaire.....	29
1.2.1.2 Dendrimères PAMAM fluorescents spécifiques.....	33
1.2.1.3 Dendrimères PAMAM fluorescents en imagerie <i>in vivo</i>	36
1.2.2 Dendrimères ayant un fluorophore au cœur et leurs applications en biologie	39

1.2.2.1	Biocapteurs.....	40
1.2.2.2	Imagerie.....	43
1.2.3	Dendrimères acides nucléiques.....	48
1.3	Dendrimères phosphorés fluorescents en biologie	50
1.3.1	Fluorophores à la surface	50
1.3.2	Dendrimère " Janus "	54
1.3.3	Nanodots organiques brillants	55
1.4	Conclusion	58
Chapitre 2	Vers un nouveau dendrimère fluorescent dans le proche-infrarouge.....	63
2.1	Introduction	66
2.2	Synthèse générale du dendrimère phosphoré	67
2.3	Dendrimère à cœur phthalocyanine	69
2.4	Dendrimère rhodamine	72
2.4.1	Monomère rhodamine-tyramine et sa cyclisation	73
2.4.2	Dendrimère-RhodamineB	76
2.5	Dendrimère pérylène	79
2.5.1	Choix du fluorophore.....	79
2.5.2	Synthèse du dendrimère pérylène	81

2.5.2.1	Rétrosynthèse du monomère dérivé de pérylène.....	81
2.5.2.2	Synthèse du monomère dérivé de pérylène.....	83
2.5.2.3	Greffage du monomère dérivé du pérylène sur le dendrimère	90
2.5.3	Synthèse du dendri- pérylène incorporant un bras espaceur	91
2.5.3.1	Synthèse du bras-espaceur.....	92
2.5.3.2	Synthèse d'un nouveau dendrimère-pérylène incorporant le bras-espaceur	94
2.5.4	Propriétés fluorescentes.....	99
2.5.5	Couplage du dendri-pérylène incorporant un bras à une protéine.....	104
2.6	Conclusion	106
2.7	Partie expérimentale	107
Chapitre 3	Dendrimères polycationiques pour la transfection.....	127
3.1	Introduction	130
3.2	Vers un nouveau dendrimère polycationique	132
3.3	Dendrimère maléimide polycationique	139
3.3.1	Synthèse du dendrimère maléimide polycationique.....	139
3.3.2	Fluorescence et propriétés physico-chimiques.....	143
3.3.3	Propriétés biologiques.....	146
3.3.3.1	Cytotoxicité du dendrimère maléimide polycationique.....	146
3.3.3.2	Interactions supramoléculaires avec l'ADN plasmidique.....	147
3.4	Conclusion	150
3.5	Partie expérimentale	151

Chapitre 4 Dendrimères-PEG hydrosolubles.....159

4.1	Introduction	162
4.2	Mise au point de la synthèse du dendrimère-PEG	162
4.2.1	Polyéthylène glycol : excellent élément en pharmacologie	162
4.2.2	Utilisation d'un PEG amine.....	165
4.2.3	Modification du monométhoxy PEG	168
4.2.4	Mise au point de la synthèse du dendrimère PEG via un PEG phénol	172
4.3	Propriétés physique et biologique	178
4.3.1	Expériences de diffusion en RMN	178
4.3.2	Cytotoxicité du dendrimère-PEG.....	181
4.4	Conclusion	182
4.5	Partie expérimentale	183

Chapitre 5 Dendrimères à absorption biphotonique.....189

5.1	Introduction	192
5.2	Dendrimères biphoton et leurs propriétés photophysiques	197
5.2.1	Dendrimères ayant des fluorophores biphoton à la surface	197
5.2.2	Dendrimère bicouche	201
5.2.3	Propriétés photophysiques.....	205
5.2.3.1	Fluorophores biphotons en surface du dendrimère.....	205

5.2.3.2	Dendrimère bicouche	208
5.3	Dendrimère-PEG à absorption biphotonique et ses propriétés	210
5.3.1	Synthèse du dendrimère-PEG à absorption biphotonique	210
5.3.2	Imagerie du dendrimère-PEG à absorption biphotonique.....	211
5.3.2.1	Etudes spectroscopiques préliminaires.....	211
5.3.2.2	Toxicité cellulaire	212
5.3.2.3	Imagerie en microscopie à absorption biphotonique	213
5.4	Conclusion	216
5.5	Partie expérimentale	217
Conclusion.....		227
Liste des produits synthétisés.....		231
Abréviations.....		241

Introduction

Les dendrimères sont des macromolécules hyperramifiées multifonctionnelles. Différentes familles de dendrimères ont été synthétisées depuis ces trente dernières années et ont trouvé des applications dans de nombreux domaines divers et variés tels que les matériaux, la catalyse ou encore la biotechnologie et la nanomédecine. Les dendrimères phosphorés ont rapidement pris une place importante dans les nanotechnologies de par leur stabilité, leur biocompatibilité et leur aspect modulable. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés particulièrement au développement de dendrimères phosphorés fluorescents en vue de leur utilisation en imagerie biologique.

Le premier chapitre est consacré à l'état de l'art sur les dendrimères fluorescents en biologie en général. Tout d'abord, l'historique et les synthèses de différents types de dendrimères ainsi que les propriétés physicochimiques qui font que ces nano-objets constituent d'excellents candidats pour les applications biologiques sont présentés. Ensuite, des exemples d'utilisation des dendrimères PAMAM fluorescents pour la biologie sont donnés. D'autres types de dendrimères fluorescents et notamment les dendrimères phosphorés fluorescents ont également beaucoup été étudiés au cours de ces dernières années et sont discutés dans ce chapitre.

Dans le deuxième chapitre, la conception et la construction d'un dendrimère possédant à la fois des fluorophores émettant dans le proche-infrarouge et un bras-espaceur capable d'accrocher un anticorps sont décrites. Les propriétés spectroscopiques du fluorophore seul et de ce nouveau dendrimère sont étudiées et le couplage de ce dendrimère à un anticorps est envisagé.

Les dendrimères polycationiques sont des agents très prometteurs pour la transfection, mais le mécanisme biologique durant le processus de transfert d'ADN n'est pas entièrement connu. Le troisième chapitre décrit l'effort dans la synthèse d'un dendrimère possédant des

polyamines afin d'améliorer la solubilité dans l'eau et présente la synthèse et les caractérisations physiques et biologiques d'un dendrimère polycationique possédant un dérivé maléimide fluorescent directement lié au cœur.

Le quatrième chapitre de cette thèse est entièrement dédié à l'élaboration d'un dendrimère phosphoré hydrosoluble neutre par greffage des chaînes de polyéthylène glycol en surface. Un dendrimère de 1^{ère} génération possédant 12 chaînes de polyéthylène glycol en surface est obtenu avec succès et ses propriétés physique et biologique attractives sont également présentées.

Une nouvelle famille de dendrimères phosphorés incorporant des fluorophores à absorption biphotonique, appelés "nanodots organiques", est en cours de développement depuis quelques années. Elle constitue une importante alternative aux quantum dots inorganiques actuellement très utilisés en imagerie biologique par fluorescence. Le cinquième chapitre décrit la synthèse de plusieurs dendrimères de ce type possédant des fluorophores à absorption biphotonique en surface et/ou dans les branches et leurs propriétés photoluminescentes sont discutées. Finalement, un nanodot organique hydrosoluble possédant des chaînes de polyéthylène glycol en surface est obtenu et pourrait potentiellement constituer un agent de contraste pour l'imagerie médicale par fluorescence du fait de sa biocompatibilité et de ses propriétés physiques intéressantes.

Chapitre

1

Les dendrimères : Généralités et cas particuliers des dendrimères fluorescents en Biologie

Table des matières

1.1 Dendrimères	6
1.1.1 Historique.....	6
1.1.2 Structure générale d'un dendrimère.....	7
1.1.3 Méthodes de synthèse des dendrimères " traditionnels "	8
1.1.4 Dendrimères acides nucléiques.....	15
1.1.5 Dendrimères contenant des hétéroatomes	16
1.1.6 Dendrimères : excellents candidats pour des applications en biologie.....	20
1.1.6.1 Propriétés intrinsèques du dendrimère	21
1.1.6.2 Propriétés physicochimiques	22
1.1.6.3 Capacité à interagir avec des systèmes biologiques	24
1.1.6.4 Biocompatibilité.....	25
1.2 Dendrimères fluorescents et leurs applications en biologie	27
1.2.1 Dendrimères poly(amidoamine)-PAMAM comme plateforme	29
1.2.1.1 Internalisation et localisation intracellulaire.....	29
1.2.1.2 Dendrimères PAMAM fluorescents spécifiques.....	33
1.2.1.3 Dendrimères PAMAM fluorescents en imagerie <i>in vivo</i>	36
1.2.2 Dendrimères ayant un fluorophore au cœur et leurs applications en biologie	39
1.2.2.1 Biocapteurs.....	40
1.2.2.2 Imagerie.....	43
1.2.3 Dendrimères acides nucléiques.....	48
1.3 Dendrimères phosphorés fluorescents en biologie	50
1.3.1 Fluorophores à la surface	50

1.3.2 Dendrimère " Janus "	54
1.3.3 Nanodots organiques brillants	55
1.4 Conclusion	58

1.1 Dendrimères

1.1.1 Historique

Les dendrimères¹ sont des macromolécules polymériques constituées des séquences répétitives de monomères, appelés "unités de branchement", à partir d'un cœur multifonctionnel de façon radiale et itérative. Les premières molécules de ce type ont été décrites par Vögtle *et coll.* en 1978². En 1981, Denkewalter *et coll.* ont breveté la synthèse des composés macromoléculaires constitués d'au moins quatre couches successives d'unités L-lysine, devenus par la suite la référence des dendrimères polylysines^{3,4,5}. Les premières structures dendritiques qui ont été réellement soigneusement étudiées et qui ont attiré l'attention générale sont les dendrimères PAMAM développés par Tomalia *et coll.*⁶ et les systèmes "arborols" développés par Newkome *et coll.*⁷. Par ailleurs Tomalia a donné à ce type de molécules le nom "dendrimère", basé sur deux mots grecs, "dendros" signifiant arbre et "meros" signifiant partie. Après la publication des premiers articles^{2,3,6,7}, qui traitaient du développement et de la réalisation de cette architecture moléculaire fondamentalement nouvelle, la recherche dans ce domaine a connu des progrès relativement lents au début, notamment limitées par les moyens analytiques de l'époque. Ce n'est qu'à partir des années 1990s que le développement des dendrimères est réellement entré en expansion⁸. En 1990, Fréchet *et coll.* ont introduit des nouveaux dendrimères à base de polyéther⁹. Sur la base des travaux de Vögtle *et coll.*, des dendrimères poly(propylèneimine) ont été développés et décrits

¹ Newkome G. R., Moorefield C. N., Vögtle F., *Dendritic Molecules: Concepts, Syntheses, Perspectives*, VCH, Weinheim **1996**

² Buhleier E., Wehner F. and Vögtle F. *Synthesis* **1978**, 78, 155.

³ Denkewalter, R. G., Kolc, J., Lukasavage, W. J. U.S. Pat. 4,-289,872, Sept. 15, **1981**

⁴ Denkewalter, R. G. Kolc, J. Lukasavage, W. J. U.S. Pat. 4,-360,646, Nov. 23, **1982**

⁵ Denkewalter, R. G. Kolc, J. Lukasavage, W. J. U.S. Pat. 4,-410,688, Oct. 18, **1983**

⁶ a) Tomalia, D. A. Baker, H. Dewald, J. R. Hall, M. Kallos, G. Martin, S. Roeck, J. Ryder, J. Smith, P. *Polym. J. (Tokyo)* **1985**, 17, 117-132; b) Tomalia, D. A. Baker, H. Dewald, J. R. Hall, M. Kallos, G. Martin, S. Roeck, J. Ryder, J. Smith, P. *Macromolecules* **1986**, 19, 2466-2468

⁷ Newkome, G. R. Yao, Z.-Q. Baker, G. R. Gupta, K. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 2003-2004

⁸ F. Vögtle and M. Fischer *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 884-905

⁹ Hawker C.J. and Fréchet J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 7638.

simultanément par Mülhaupt *et coll.*¹⁰ et par Meijer *et coll.*¹¹ en 1993. En cherchant à créer de nouvelles structures dendritiques et à trouver de nouvelles propriétés physico-chimiques, de nouveaux dendrimères contenant des hétéroatomes, en particulier le silicium¹² et le phosphore¹³, ont également été développés. En 1994, le groupe Majoral et Caminade a été le premier à synthétiser des dendrimères phosphorés neutres¹⁴.

1.1.2 Structure générale d'un dendrimère

Les dendrimères sont constitués de trois domaines principaux distincts (cf. Figure 1-1) : i) un cœur central ; ii) des branches provenant du cœur, constituées d'une répétition des unités possédant au moins un point de jonction et organisées selon une géométrie radiale pour former une série de couches concentriques appelées "générations" ; iii) nombre de groupes fonctionnels terminaux, généralement localisés à l'extérieur de la macromolécule et qui joue un rôle clé dans les propriétés physico-chimiques et chimiques du dendrimère¹⁵. En dehors de ces trois éléments principaux, les cavités formées à l'intérieur de cette architecture particulière constituent une autre caractéristique des dendrimères. En effet, l'accessibilité de ces cavités diffère selon la nature du solvant, les dendrimères peuvent prendre des formes complètement différentes dans des solvants différents¹⁶. Ces cavités peuvent également contenir des petites molécules pour former des "boîtes" dendritiques¹⁷.

¹⁰ Wörner, C.; Mülhaupt, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1306-1308

¹¹ De Brabander-van den Berg, E. M. M.; Meijer, E. W. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1308-1311

¹² Rebrov E. A., Muzafarov A., Papkov V. S. and Zhdanov A. A. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1989**, 309, 376.

¹³ Rengan K. and Engel R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 : Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)* **1991**, 987

¹⁴ Launay N., Caminade A.-M., Lahana R. and Majoral J.-P. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1589.

¹⁵ Caminade A.-M., Laurent R. and Majoral J.-P. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, 57, 2130.

¹⁶ Leclaire J., Coppel Y., Caminade A.-M. and Majoral J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2304.

¹⁷ Janson J. F. G. A., De Brander-van den berg E. M. M. and Meijer E. W. *Science* **1994**, 266, 1226.

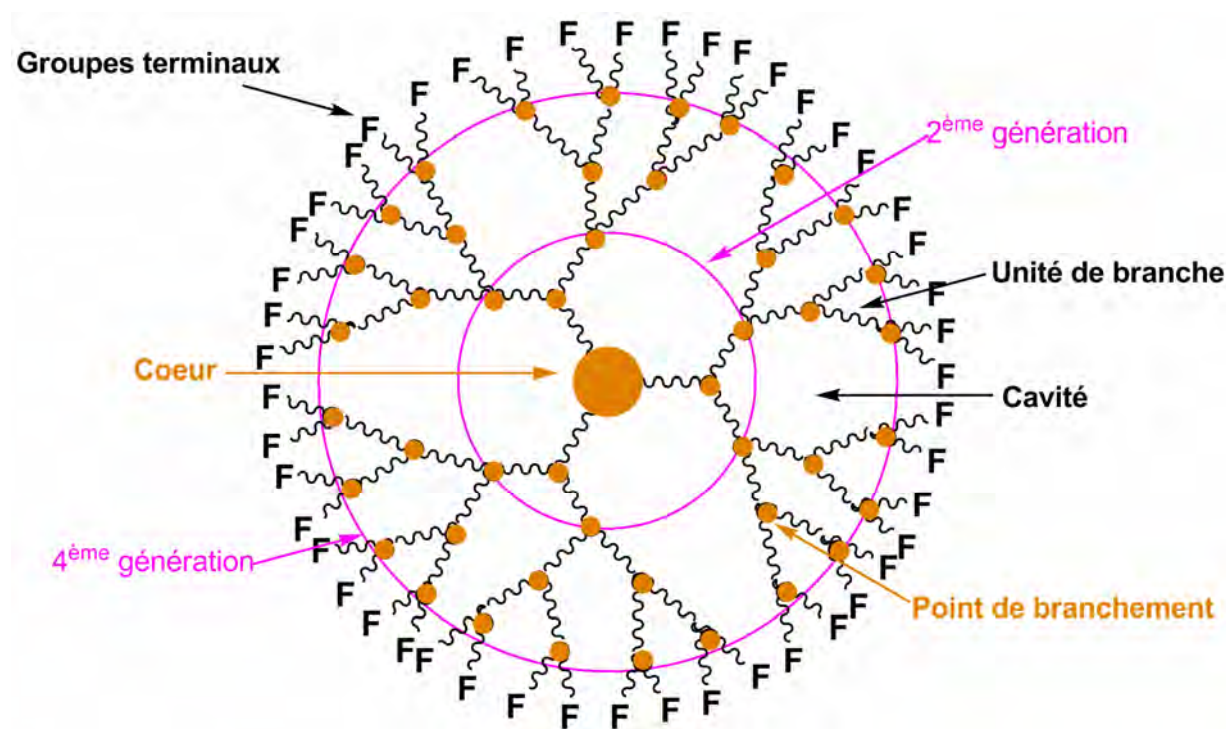


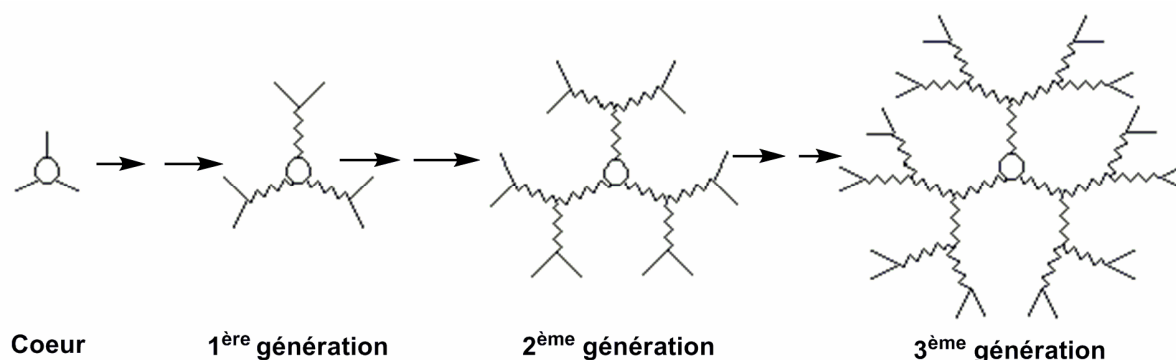
Figure 1-1 : Schéma symbolique d'un dendrimère de 4^{ème} génération

1.1.3 Méthodes de synthèse des dendrimères "traditionnels"

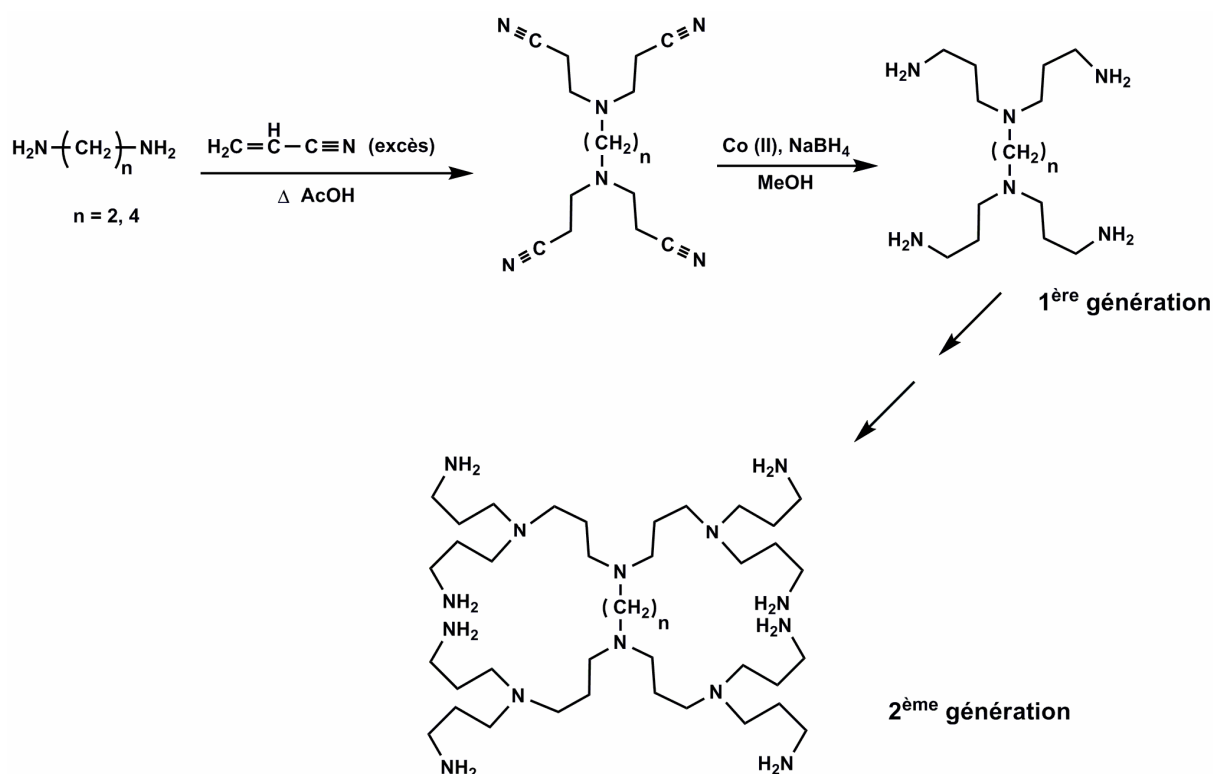
Les dendrimères sont principalement synthétisés selon deux méthodes principales : divergente et convergente¹⁸. Les méthodes les plus utilisées sont les méthodes divergentes¹⁹ (cf. Figure 1-2), dans lesquelles la synthèse s'effectue du cœur vers la périphérie, en greffant un nombre de plus en plus grand de petites molécules, appelées "monomères", sur la surface multifonctionnelle du dendrimère. Dans ce cas, la croissance dendritique est limitée par l'encombrement stérique en surface pour les générations élevées²⁰.

¹⁸ Tomalia D. A. and Fréchet J. M. J. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* **2002**, 40, 2719-2728

²⁰ De Gennes P. G., Hervet H. *J. Phys. Lett.* **1983**, 44, 351.

Figure 1-2 : Synthèse divergente du dendrimère¹⁹

Le tout premier dendrimère, décrit par Vögtle *et coll.* en 1978, a été synthétisé selon une méthode divergente, jusqu'à la deuxième génération (cf. Figure 1-3). Chaque génération nécessite deux étapes, dont une étape de réduction qui est difficile à réaliser proprement pour des générations plus élevées à cause du grand nombre de fonctions de surface. Cette méthode de synthèse a été reprise et optimisée par Meijer *et coll.*¹¹ en 1993 où la première étape, addition de Michael entre une amine primaire et un excès d'acrylonitrile, est réalisée dans l'eau et l'étape de réduction se fait par hydrogénation avec le cobalt de Raney.

Figure 1-3 : Synthèse du premier dendrimère par Vögtle *et coll.*²

Le dendrimère le plus utilisé au monde, le PAMAM pour PolyAMidoAMine, est également synthétisé selon une méthode divergente (cf. Figure 1-4). La première étape

consiste en la formation d'une liaison amide entre les groupements ester du cœur et des groupements amines de l'éthylène diamine en large excès. La seconde étape est une addition de type Michael entre les groupements amines à la surface et l'acrylate de méthyle. La répétition de ces deux étapes itératives permet la préparation d'un tel dendrimère jusqu'à la 10^{ème} génération⁶.

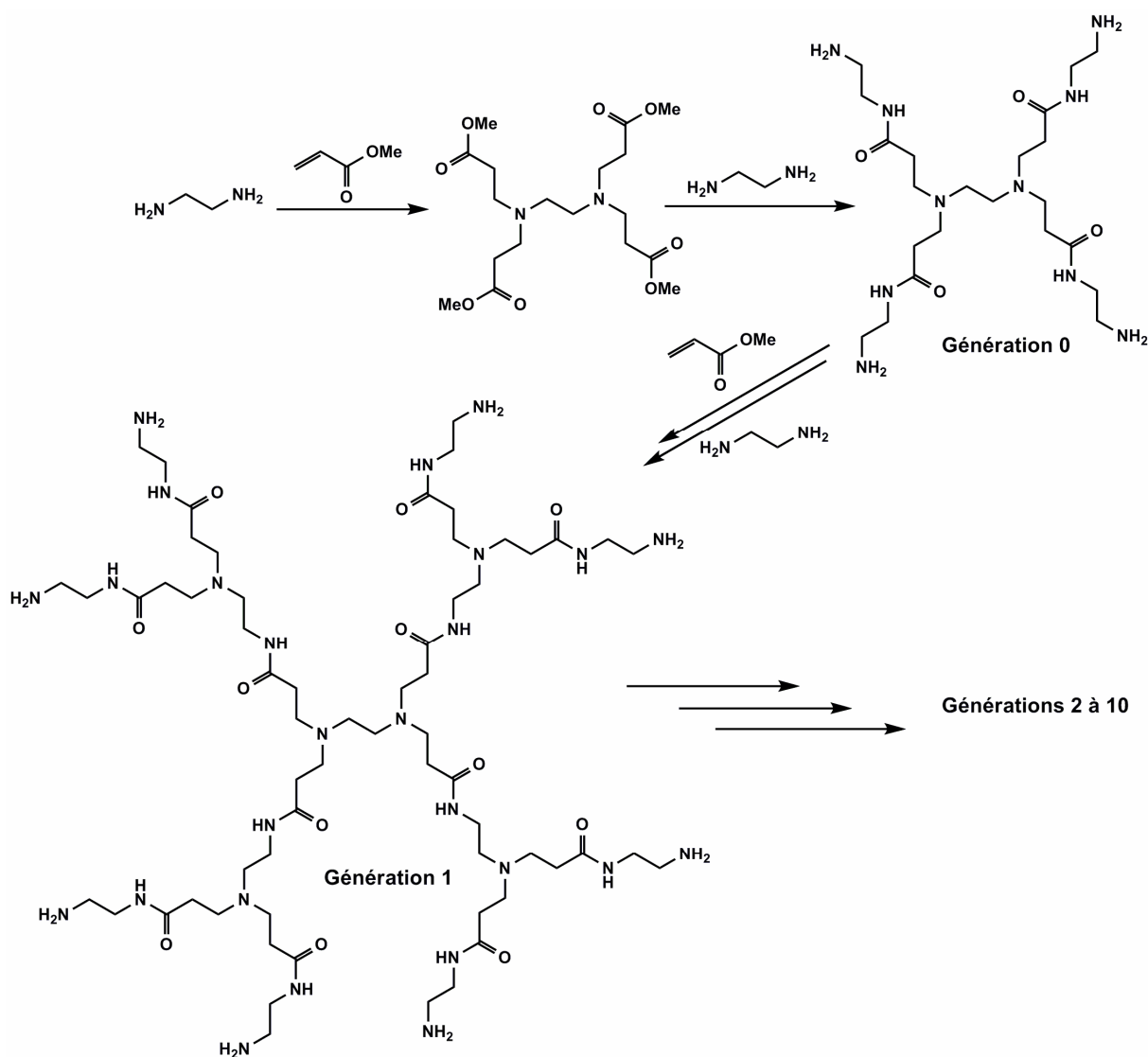


Figure 1-4 : Synthèse du dendrimère PAMAM

Un autre exemple de synthèse dendritique divergente est le dendrimère polyéther de type Newkome⁷ développé en 1985 (cf. Figure 1-5).

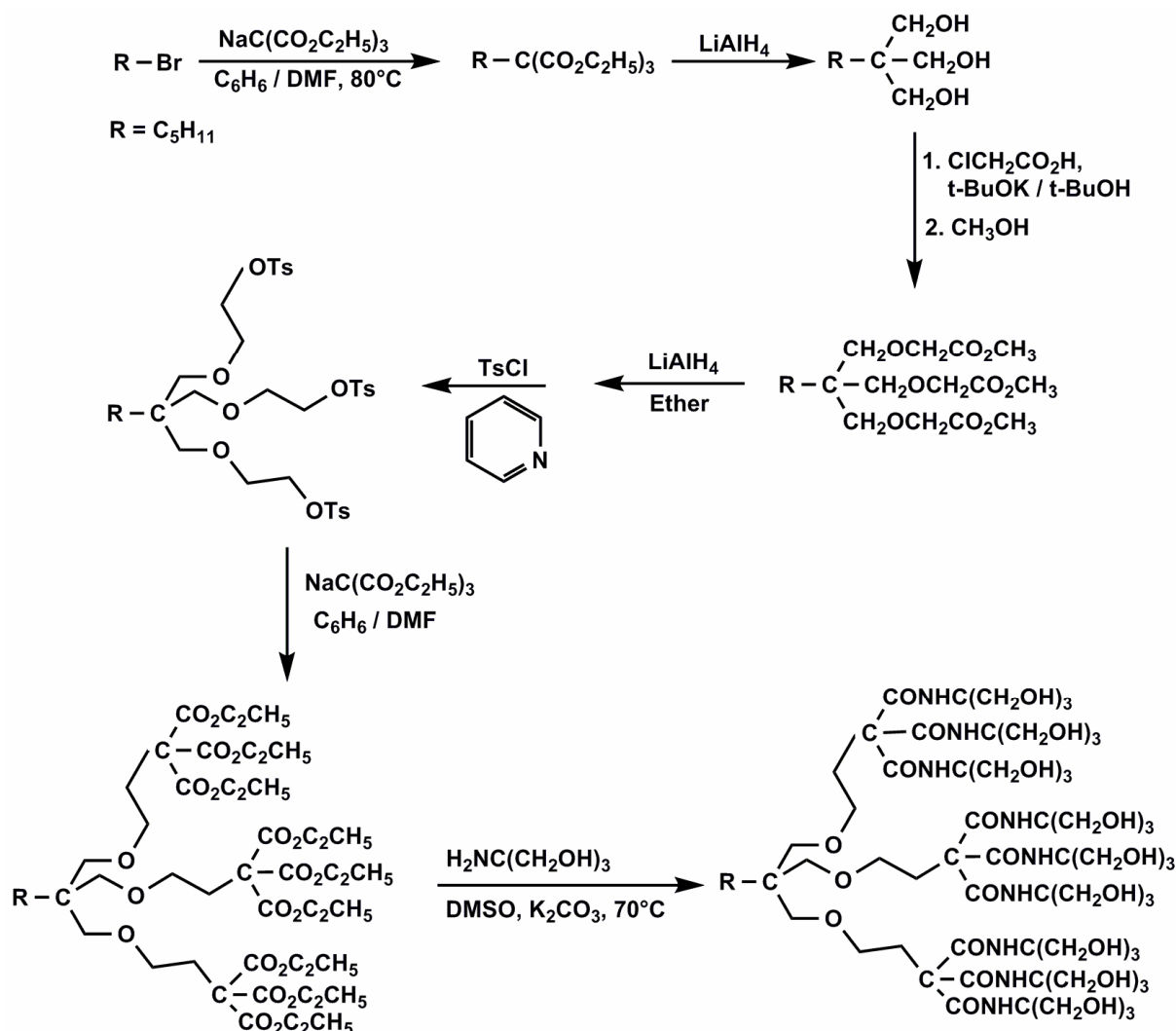


Figure 1-5 : Synthèse du dendrimère de type Newkome

Dans cette méthode divergente de synthèse, la multiplication du nombre de groupements périphériques dépend de la multiplicité (en général 2 ou 3) des monomères employés dans les points de branchement. Ainsi le dendrimère peut être construit étape par étape jusqu'à ce que l'encombrement stérique empêche les réactions sur les groupements terminaux⁸. D'autres problèmes sont également présents dans la méthode divergente. Etant donné que le nombre de groupements terminaux augmente de manière exponentielle, il est de plus en plus difficile d'avoir une transformation complète de tous les groupements terminaux avec la croissance dendritique. Ces structures avec défauts peuvent s'accumuler au fur et à mesure et ne sont pas toujours séparables des structures parfaites, car elles possèdent dans la plupart des cas des propriétés physiques similaires aux dendrimères "parfaits". Néanmoins,

malgré ces désavantages, la méthode divergente reste actuellement l'approche préférée pour préparer des dendrimères point de vue industriel²¹.

La méthode de synthèse convergente a été inventée par Fréchet *et coll.* en 1990. A l'inverse de la méthode divergente, la synthèse convergente s'effectue de la périphérie vers le cœur, en associant entre elles des molécules de plus en plus grosses, ayant en permanence une fonction au niveau du cœur (cf. Figure 1-6). Ces molécules sont généralement appelées "dendron", elles peuvent être finalement greffées sur un cœur qui n'aura plus de fonction réactive après le couplage, donnant ainsi un dendrimère. Un exemple de synthèse dendritique convergente est celle du dendrimère de type Fréchet (cf. Figure 1-7). La première étape consiste en la condensation du bromure de benzyle avec les deux groupements phénol de l'alcool dihydroxybenzylique. L'alcool benzylique est ensuite activé pour donner le bromure de benzyle correspondant. Cette séquence de condensation suivie de l'activation est répétée pour faire croître les dendrons jusqu'à la 4^{ème} génération. L'étape finale consiste à coupler ces dendrons à un cœur polyfonctionnel pour créer un dendrimère de 4^{ème} génération.

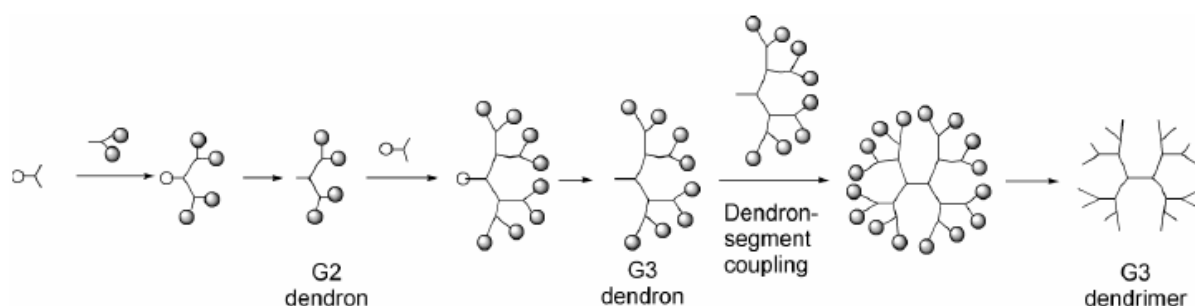
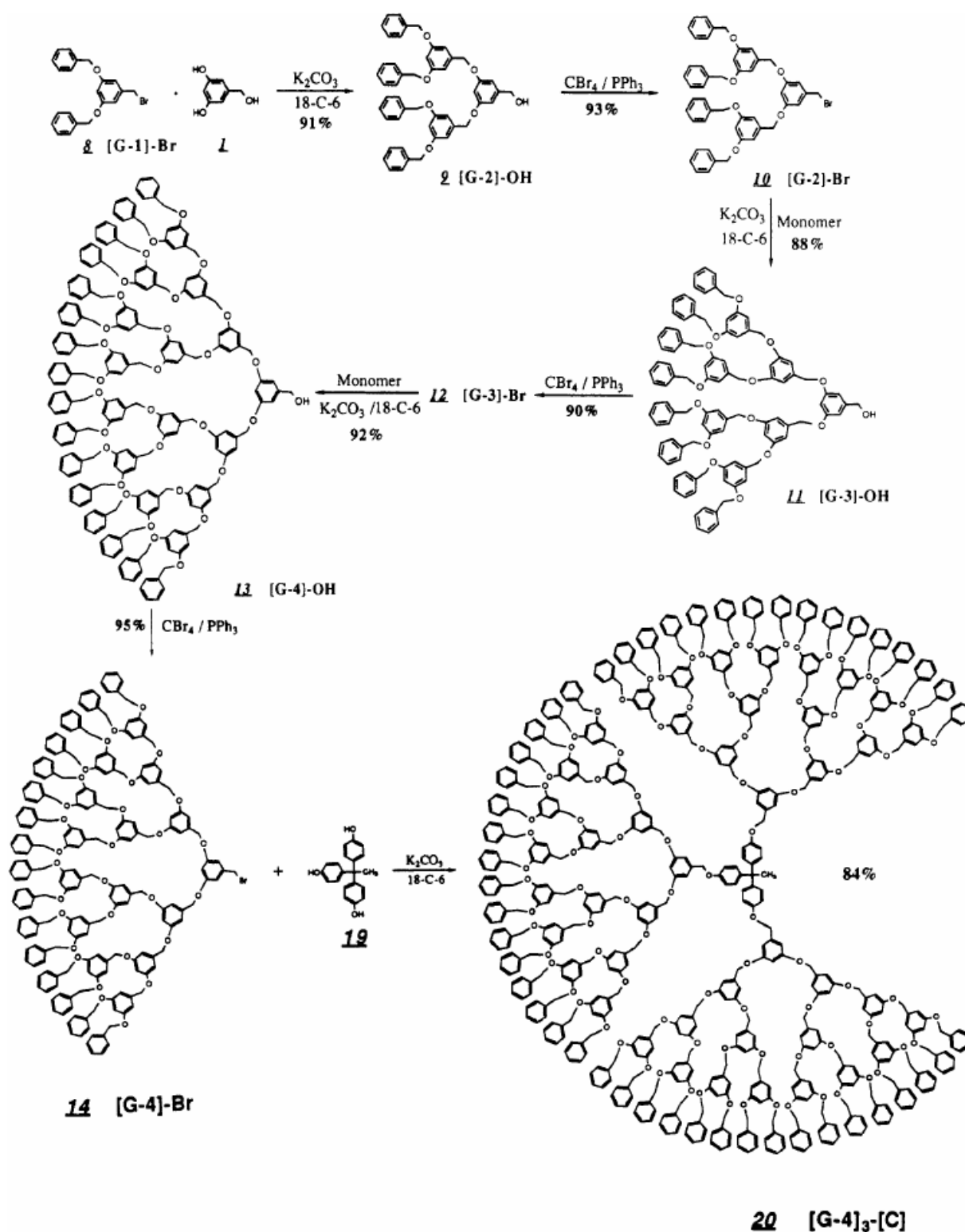


Figure 1-6 : Synthèse convergente du dendrimère²²

Cette méthode permet d'éviter un large excès de monomères comme c'est le cas de la méthode divergente. Elle facilite également l'élimination des produits secondaires, par exemple par l'utilisation de la chromatographie d'exclusion stérique. Néanmoins, elle atteint beaucoup plus rapidement la limite de générations que la méthode divergente du fait des problèmes d'encombrement stérique au niveau du cœur. Ce problème pourrait être moins significatif avec des monomères de structure plus flexible.

²¹ Esfand R. and Tomalia D. A. *Drug Discovery Today* **2001**, 6, 427.

²² Boas U. and Heegaard P. M. H. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 43.

Figure 1-7 : Première synthèse convergente de dendrimère⁹

Les exemples précédents montrent que la plupart des dendrimères n'ont qu'un seul type de fonctions en surface et que toutes les générations sont constituées par les mêmes enchaînements chimiques. Cependant, il existe quelques dendrimères ayant des structures différentes (cf. Figure 1-8). Ils sont appelés "layer-block" lorsque certaines générations ont

des enchaînements chimiques différents de ceux d'autres générations, ils sont généralement obtenus par la méthode divergente^{23,24}. Lorsqu'une partie de la surface comporte des fonctions différentes de celles d'autres parties, ces dendrimères sont appelés "surface-block"^{25,26}. Lorsque certaines parties du dendrimère, depuis le cœur, sont différentes d'autres parties, nous parlons de "segment-block"^{27,28}. Ce dernier type de dendrimères est obtenu par synthèse convergente.

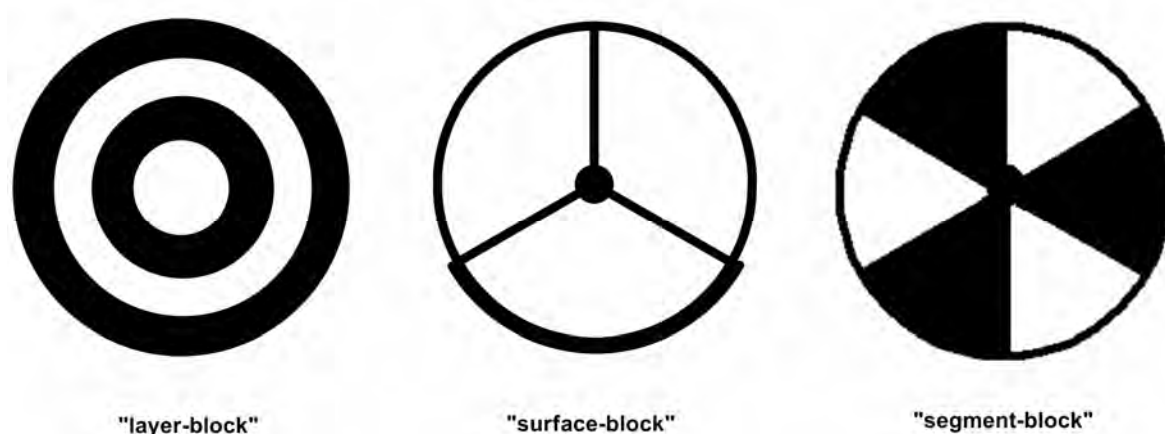


Figure 1-8 : Représentation des dendrimères "block"

²³ Lartigue M.-L., Launay N., Donnadiou B., Caminade A.-M. and Majoral J.-P. *Bulletin de la Société chimique de France* **1997**, 134, 981.

²⁴ Funayama K., Imae T., Aoi K., Tsutsumiuchi K., Okada M. Furusaka M. and Nagao M. *J. Phys. Chem. B.* **2003**, 107, 1532.

²⁵ Maraval V., Maraval A., Spataro G., Caminade A.-M., Majoral J.-P., Dong H. K. and Knoll W. *New journal of chemistry* **2006**, 30, 1731.

²⁶ Yanagimoto Y., Takaguchi Y. and Tuboi S. *Polymer journal* **2006**, 38, 1230.

²⁷ Caminade A.-M. and Majoral J.-P. *Coordination chemistry reviews* **2005**, 249, 1917.

²⁸ Merve Kose M., Yesilbag G. and Sanyal A. *Org. Lett.* **2008**, 10, 2353.

1.1.4 Dendrimères acides nucléiques

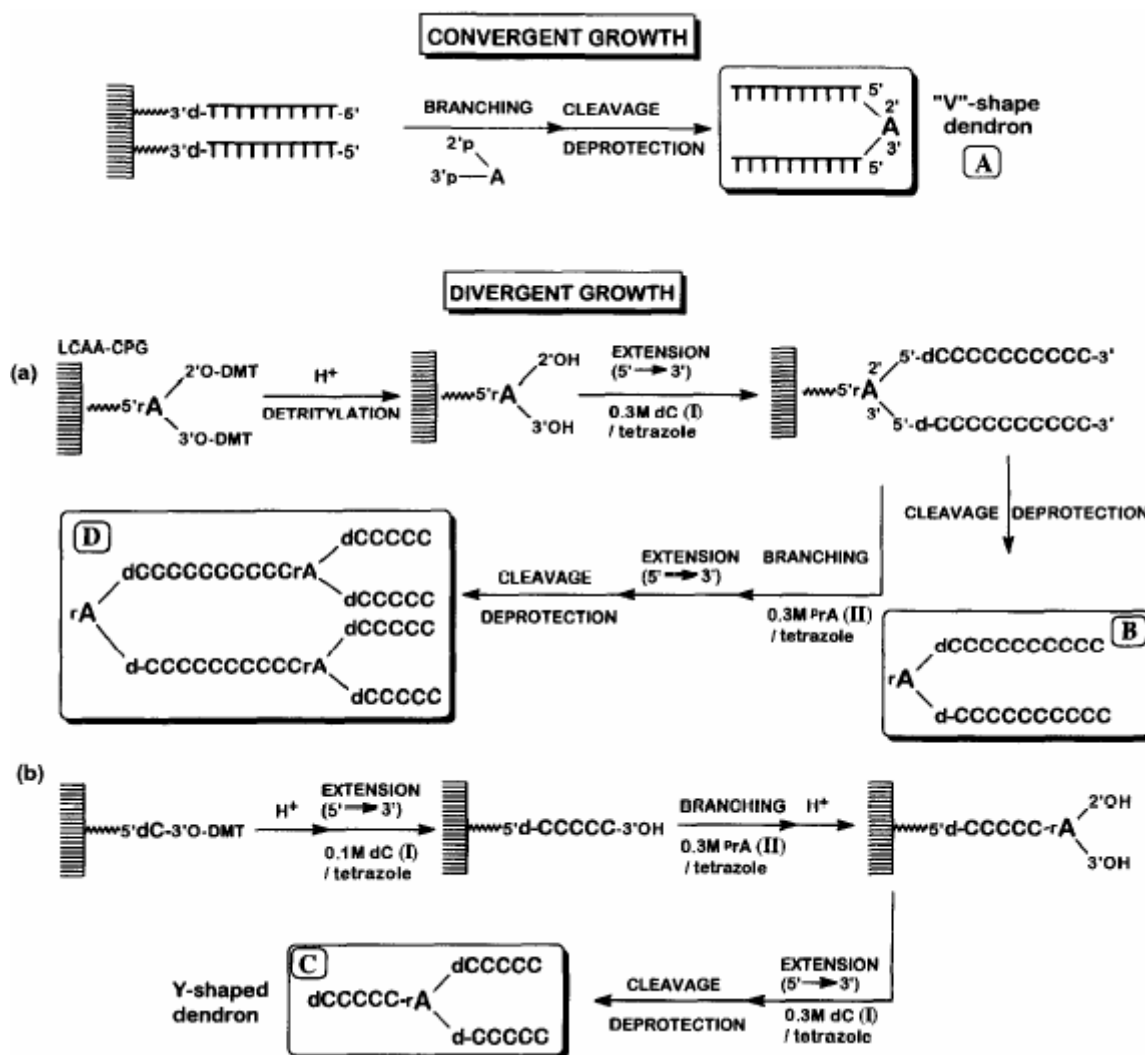


Figure 1-9 : Synthèse des dendrimères acide nucléique^{29,30}

En dehors des dendrimères utilisant des blocks de construction organiques synthétiques, Hudson et Damha ont développé des dendrimères acides nucléiques d'abord selon une synthèse convergente²⁹ en 1993 puis selon une méthode divergente sur support solide³⁰ en 1998 (cf. Figure 1-9). Cette classe de dendrimères présente un grand intérêt pour les biochimistes car leur structure est similaire à celle des "lariat RNA" (ARN ayant une structure à lasso) et des msDNA (multicopy single-stranded DNA en anglais et multicopie d'ADN simple-brin) qui sont des structures inhabituelles mais très importantes dans le

²⁹ Hudson R. H. E. and Damha M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 2119.

³⁰ Hudson R. H. E. , Robidoux S. and Damha M. J. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, 1299.

processus d'épissage de l'ARN messenger^{31,32}. Les deux méthodes sont réalisées sur le support solide LCAA-CPG (Long-Chain AlkylAmine Controlled Pore Glass) avec un ADN-synthétiseur automatique mais emploient deux synthons différents. De plus la synthèse divergente présente la particularité de mener une élongation dans le sens non conventionnel de l'extrémité 5' vers 3' au lieu de l'extrémité 3' vers 5'.

1.1.5 Dendrimères contenant des hétéroatomes

Les dendrimères basés sur le silicium sont les premiers dendrimères contenant des hétéroatomes, ils ont été synthétisés en 1989 par Rebrov *et coll.*¹². Trois types de liaisons sont utilisés aux points de branchement : siloxane (Si-O), carbosilane (Si-C) et silane (Si-Si). La plupart des dendrimères contenant le silicium sont synthétisés selon un mode divergent^{33,34}, seulement quelques exemples concernent des méthodes convergentes³⁵. Les dendrimères de type carbosilane contenant des groupements SiC₄ aux points de branchement sont synthétisés pour la première fois en 1992 et constituent la plus importante classe de dendrimères contenant le silicium³⁶, grâce à leur excellente stabilité thermique et chimique et à la possibilité de les synthétiser jusqu'à de très hautes générations (7^{ème} génération). Tous les dendrimères carbosilane sont obtenus avec de bons rendements en alternant l'alcénylation avec des réactifs de Grignard et l'hydrosilylation (cf. Figure 1-10).

³¹ Hudson R. H. E., Ganeshan K. and Damha M. J. In carbohydrate Modifications in Antisense Research. (Sanghvi, Y. S., Cook, P. D. eds), ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, D. C. **1994**, 01580, pp 133.

³² Sharp P. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1229.

³³ Morikawa A., Kakimoto M. A. and Imai Y. *Macromolecules* **1991**, 24, 3469.

³⁴ Morikawa A., Kakimoto M. A. and Imai Y. *Polym. J.* **1992**, 24, 573.

³⁵ Morikawa A., Kakimoto M. A. and Imai Y. *Macromolecules* **1992**, 25, 3247.

³⁶ Majoral J.-P. and Caminade A. M. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 845.

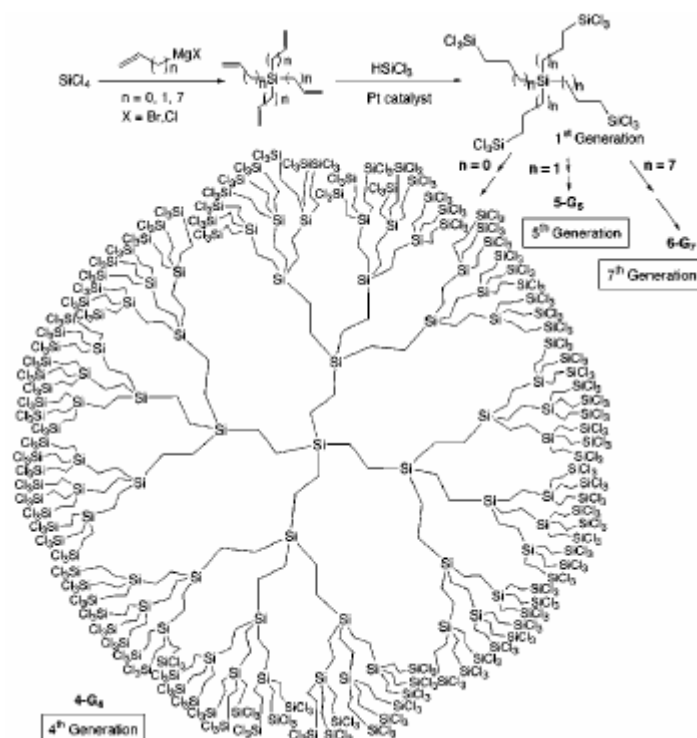


Figure 1-10 : Synthèse d'un dendrimère carbosilane³⁶

En 1990, Rengan and Engel¹³ ont rapporté la préparation d'une nouvelle catégorie de macromolécules en cascade dans laquelle le cœur et les points de branchement sont des ions phosphonium quaternaires. Les premiers dendrimères neutres contenant le phosphore possèdent des liaisons P-N, P-O ou P-C, et ont été décrits en 1994¹⁴. Depuis cette date, la synthèse et la chimie de ces nouvelles macromolécules sont en pleine expansion. Une stratégie simple, générale et efficace pour préparer les dendrimères phosphorés neutres consiste en l'itération de seulement deux étapes : substitution nucléophile des atomes de chlore par le 4-hydroxybenzaldéhyde et condensation entre l'aldéhyde et un dérivé phosphorhydrazide (cf. Figure 1-11). Cette méthode a permis de mener la croissance dendritique jusqu'à l'obtention d'un dendrimère de 12^{ème} génération²³. Le détail de la synthèse et les caractérisations de ces dendrimères phosphorés seront donnés dans le chapitre II.

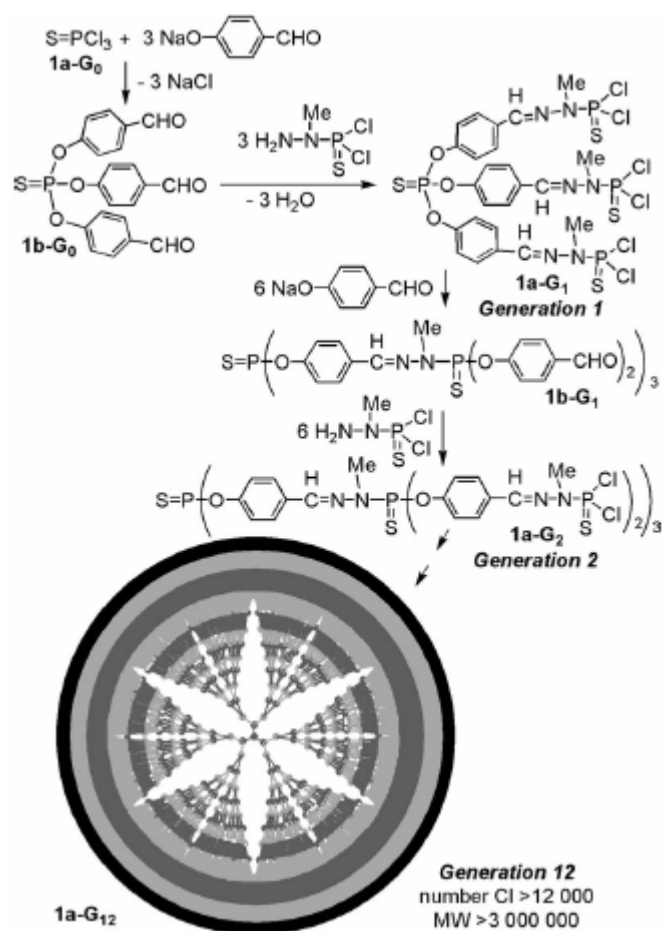


Figure 1-11 : Synthèse du dendrimère phosphoré à cœur PSCl_3 jusqu'à la 12^{ème} génération³⁷

³⁷ Caminade A.-M., Maraval V., Laurent R., Turrin C.-O., Sutra P., Leclaire J., Griffe L., Marchand P., Baudoin-Dehoux C., Rebout C. and Majoral J.-P. *C. R. Chimie* **2003**, 6, 791.



Figure 1-12 : Dendrimère germanium ³⁶

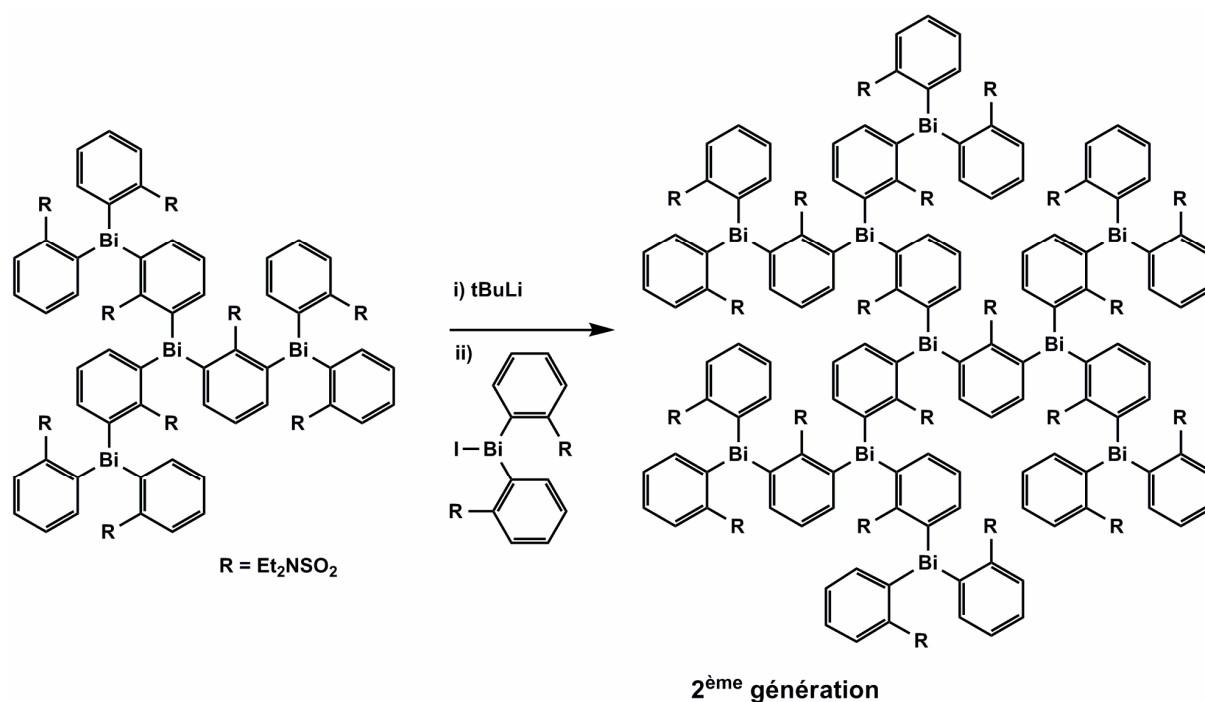
organique et n'est pas un bloc de construction du dendrimère⁴¹.

³⁸ Huc V., Boussaguet P. and Mazerolles P. *J. Organomet. Chem.* **1996**, 512, 253.

³⁹ Suzuki H., Kurata H. and Matano Y. *Chem. Commun.* **1997**, 2295.

⁴⁰ Werner K. and Herbert S. United States Patent 6156873

⁴¹ Qualmann B., Kessels M. M., Musiol H. J., Sierralta W. D., Jungblut P. W. and Moroder L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 909.

Figure 1-13 : Dendrimère Bismuth³⁶

1.1.6 Dendrimères : excellents candidats pour des applications en biologie

Pour expliquer pourquoi les dendrimères sont d'excellents candidats pour des applications biologiques, il faut tout d'abord les situer par rapport à d'autres structures macromoléculaires. Il existe dans le monde des macromolécules quatre types d'architectures principales (cf. Figure 1-14) : i) polymères linéaires ; ii) polymères réticulés ; iii) polymères branchés ; iv) macromolécules dendritiques. Les trois premières catégories correspondent à des architectures traditionnelles de polymères et sont reconnues pour générer davantage des produits polydisperses, avec des masses moléculaires différentes et des degrés de polydispersité variables⁴². Contrairement à ces structures classiques, la synthèse des polymères dendritiques permet de générer des architectures macromoléculaires monodisperses, avec des structures parfaitement contrôlées. La catégorie des polymères dendritiques peut être divisée en quatre sous-classes selon son degré de contrôle structural : a) polymères hyperramifiés aléatoires ; b) polymères arborescents ; c) dendrons ; d) dendrimères¹⁸. Historiquement, il a été largement reconnu que la topologie d'une macromolécule influence de manière significative ses propriétés et ses développements

⁴² Svenson S. and Tomalia D. A. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, 57, 2106.

relatifs. Les polymères dendritiques en particulier les dendrimères possèdent des topologies, des fonctions et des dimensions comparables à celles des systèmes biologiques^{43,44,45} notamment à celles d'une protéine.

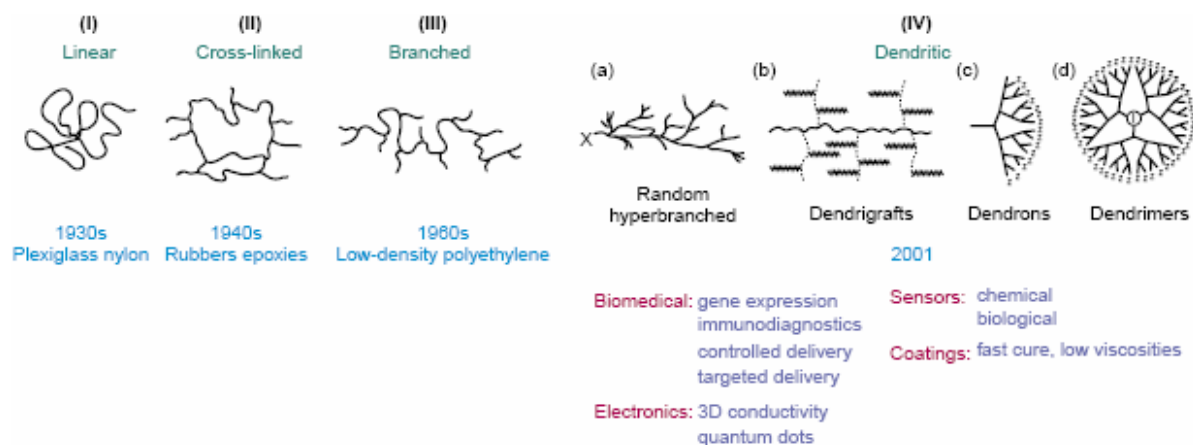


Figure 1-14 : Représentation des quatre classes principales d'architectures macromoléculaires²¹

1.1.6.1 Propriétés intrinsèques du dendrimère

Comme nous en avons déjà parlé précédemment, la structure du dendrimère peut être divisée en trois parties : i) la surface multivalente avec un grand nombre de sites réactifs potentiels, ii) les branches formant un microenvironnement protégé par la surface et iii) le cœur qui est hautement protégé pour des générations élevées. L'intérieur du dendrimère est ainsi bien adapté pour l'encapsulation des molécules hôtes. Ces trois parties du dendrimère peuvent être modifiées pour des fins spécifiques telles que des biocapteurs ou des transporteurs de médicaments. Les surfaces multivalentes des dendrimères de haute génération peuvent contenir un très grand nombre de groupements fonctionnels qui pourraient favoriser les interactions "host-guest" entre les dendrimères et d'autres entités chimiques ou biologiques.

⁴³ Tomalia D. A. *Aldrichimica Acta* **2004**, 37, 39.

⁴⁴ Tomalia D. A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J. and Smith P. *Macromolecules* **1986**, 19, 2466.

⁴⁵ Tomalia D. A. *Sci. Am.* **1995**, 272, 62.

1.1.6.2 Propriétés physicochimiques

Les dendrimères ont souvent été comparés à des protéines, non seulement en termes de taille²¹ (cf. Figure 1-15) mais aussi en termes de comportement face aux changements de l'environnement extérieur. C'est pourquoi les dendrimères sont de très bons candidats pour mimer les protéines⁴⁶. Des études de dynamique moléculaire ont montré que les dendrimères peuvent adopter des conformations "native" ou "dénaturée" en fonction de la polarité, de la force ionique et du pH du solvant dans lequel ils se trouvent, comme les protéines.

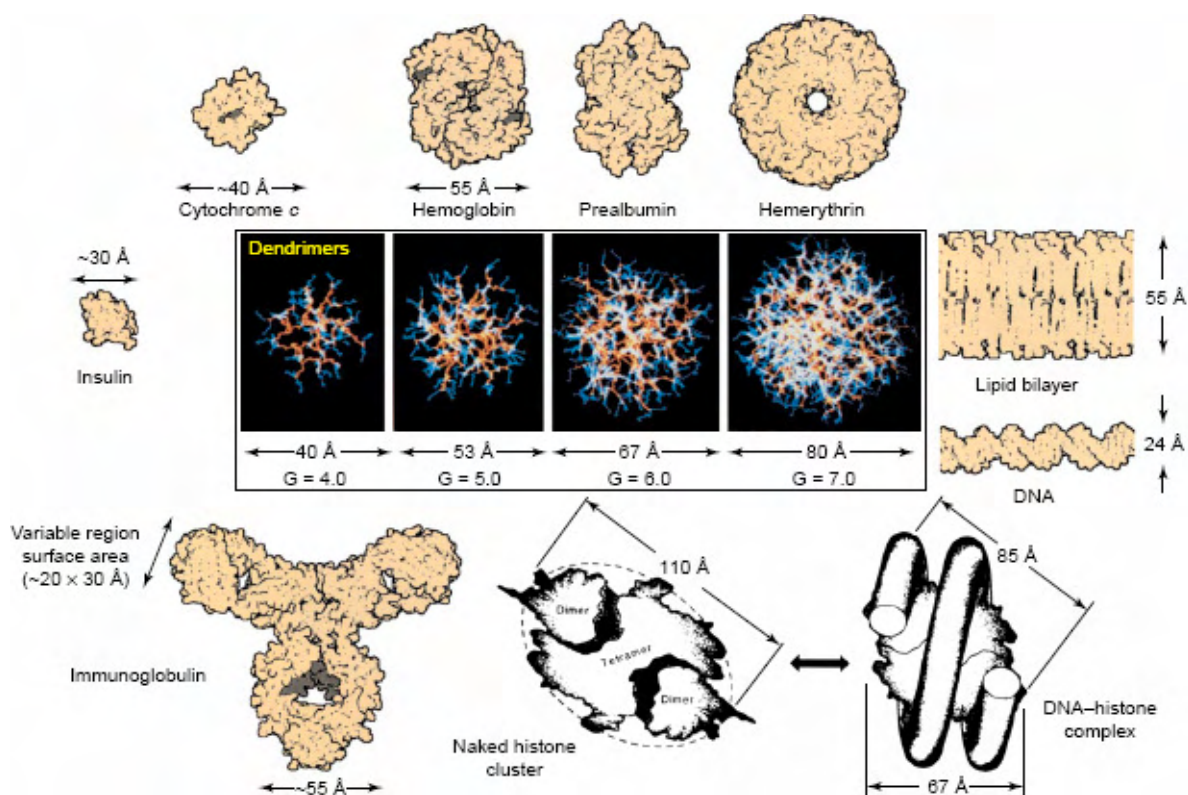


Figure 1-15 : Comparaison des dendrimères PAMAM, Poly(AMidoAMine) (cœur NH₃, de G4 à G7) avec des protéines, une bicouche lipidique typique et l'ADN²¹

La polarité du solvant affecte fortement la structure tridimensionnelle des dendrimères. Des calculs théoriques menés par De Gennes et Hervet sur les dendrimères PAMAM ont montré que les dendrimères ont une densité moléculaire plus importante à la périphérie lorsqu'ils sont solubilisés dans un bon solvant²⁰. Selon eux, la partie périphérique du dendrimère devient de plus en plus dense avec l'augmentation des générations. Les études

⁴⁶ Ferrin D. and Avnir D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1379.

menées par Lescanec et Muthukumar ont permis de proposer une densité moléculaire uniforme partout dans le dendrimère, indicateur du degré de repliement prononcé⁴⁷. Plus tard, Murat et Crest ont tiré de leurs calculs des conclusions contraires à celles de De Gennes, ils ont montré que la partie la plus dense des dendrimères PAMAM est localisée près du cœur, et ce indépendamment des solvants⁴⁸. D'autres études théoriques et expérimentales réalisées sur les dendrimères PPI fonctionnalisés par des amines et sur les dendrimères PAMAM ont montré la tendance des solvants apolaires à induire une augmentation de densité au cœur due aux interactions polaires intramoléculaires et une diminution de densité moléculaire à la surface. Dans les solvants polaires, les branches des dendrimères PAMAM sont mieux solvatées, ainsi la densité moléculaire à la surface augmente à cause des liaisons hydrogène intramoléculaires, ce qui revient à soutenir le point de vue de De Gennes. Ce phénomène se renforce avec l'augmentation des générations puisque les fonctions de surface se rapprochent⁴⁹. Ces propriétés d'adaptation des dendrimères en fonction des solvants permettent leur utilisation comme nanocontainer de substances bioactives ou encore comme délivreur de médicaments.

Les changements de conformation des dendrimères dépendent de la nature des groupes terminaux. Pour les dendrimères PPI aux extrémités amines et les dendrimères PAMAM qui ont des amines primaires à la surface, à des valeurs de pH inférieures à 9, des conformations étendues sont observées à cause des forces répulsives entre les amines positivement chargées. A des valeurs de pH supérieures à 9, c'est les interactions hydrogènes qui dominent, nous observons alors des conformations plus denses (cf. Figure 1-16). Pour les dendrimères PPI aux extrémités carboxyliques⁵⁰, les conformations les plus étendues sont observées pour des valeurs de pH égales à 4 et 11, à cause des forces répulsives entre les amines intérieures positivement chargées à pH 4 et entre les carboxylates négativement chargés à pH 11.

⁴⁷ Lescanec R. L. and Muthukumar M. *Macromolecules* **1990**, 23, 2280.

⁴⁸ Murat M. and Crest G. S. *Macromolecules* **1996**, 29, 1278.

⁴⁹ Ballauff M. *Topics Curr. Chem. Dendrimères III Design, Dimension, Function*, **2001**, 212, 177.

⁵⁰ Rietveld I. B., Bouwman W. G., Baars M. W. P. L. and Heenan R. K. *Macromolecules* **2001**, 34, 8380.

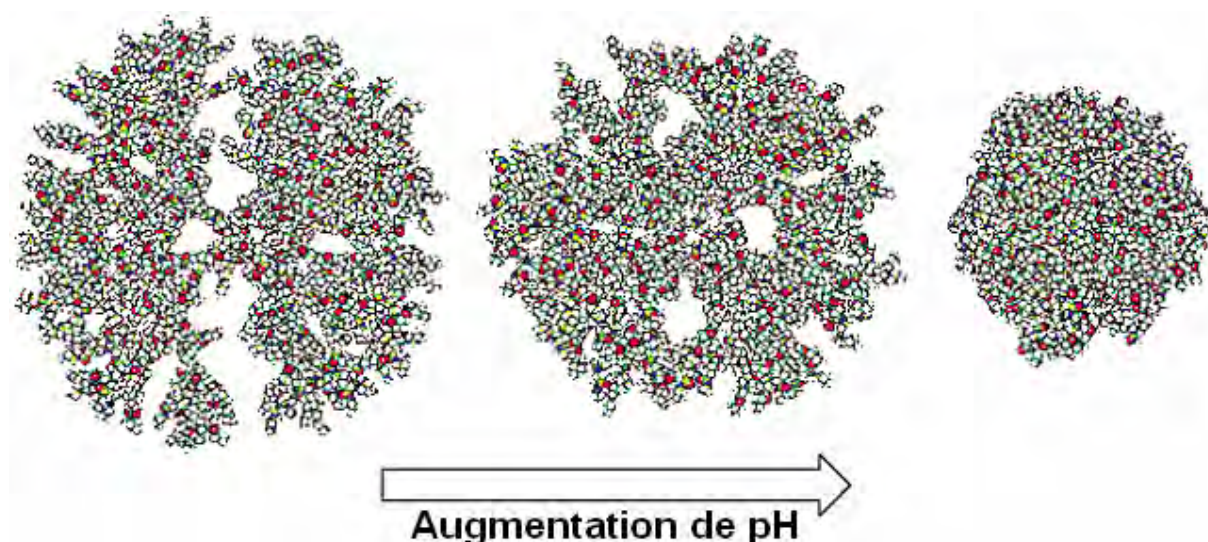


Figure 1-16 : Changement de conformation du dendrimère PAMAM avec l'augmentation du pH²²

1.1.6.3 Capacité à interagir avec des systèmes biologiques

Les interactions multivalentes sont présentes partout dans la nature, des liaisons divalentes des anticorps et des récepteurs aux interactions hautement multivalentes des doigts de Geckos⁵¹. La multivalence permet des activités interactives beaucoup plus fortes comparées aux interactions classiques monomériques. Les améliorations synergiques de certaines activités catalytiques et de liaisons sont généralement dues à l'effet dendritique⁵². L'effet dendritique est un effet coopératif dans un système multivalent conduisant à une augmentation non linéaire d'activité par rapport au nombre de valences. Ce phénomène est largement répandu dans le monde des enzymes (par exemple les enzymes allostériques). Il y a en réalité deux phénomènes à prendre en compte et à différencier. Le dendrimère possède un grand nombre d'entités de liaison, ce qui augmente de manière linéaire l'efficacité de liaison puisqu'une mole de ligand est liée par plusieurs moles de sites de liaisons du dendrimère. C'est un effet additif simple. L'effet dendritique joue un rôle lorsque les liaisons simultanées sur un même ligand conduisent à une augmentation synergique de l'affinité globale.

⁵¹ Autumn K., Liang Y. C. A., Tonia Hsieh S., Zesch W., Chan W. P., Kenny T. W., Fearing R. and Full R. J. *Nature* **2000**, 405, 681.

⁵² Lundquist J. J., Debenham S. D. and Toone E. J. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 8245.

La multivalence du dendrimère permet également d'augmenter la spécificité des interactions, essentiellement grâce à l'augmentation synergique de l'affinité pour le ligand en question. Les dendrimères sont, par conséquent, parfaitement convenables pour interagir avec des entités multimériques synthétiques, semi-synthétiques ou biologiques de manière définie.

1.1.6.4 Biocompatibilité

Le domaine des dendrimères a été largement exploré ces dernières années pour des applications biologiques et médicales. Pour être utilisable, le dendrimère doit être non toxique, non immunogène (s'il n'est pas conçu pour être utilisé comme vaccin), capable de franchir des barrières biologiques telles que les membranes cellulaires, les barrières des tissus sanguins, capable de rester suffisamment longtemps dans la circulation sanguine sans être métabolisé par des enzymes ou éliminé par le rein pour avoir un effet clinique et également capable de cibler des structures spécifiques.

Comme toutes les macromolécules polycationiques, les dendrimères aux extrémités amines sont toxiques⁵³ *in vitro*. Ils déstabilisent les membranes cellulaires et provoquent ainsi la lyse et par la suite la mort des cellules. Cette toxicité est favorisée par les interactions électrostatiques entre la membrane cellulaire négativement chargée et la surface dendritique positivement chargée. Ces dendrimères polycationiques sont d'autant plus cytotoxiques qu'ils possèdent plus de charges positives et qu'ils sont flexibles. Les dendrimères polyanioniques ayant des groupements carboxylate à la surface semblent moins toxiques que les dendrimères polycationiques. Cependant la biocompatibilité des dendrimères n'est pas seulement régie par la surface de ces derniers, mais aussi par la structure interne. Les dendrimères basés sur les polyéthers aromatiques ayant des carboxylates à la surface ont provoqué l'hémolyse des cellules de sang de rat après 24 heures d'incubation⁵⁴. La toxicité des dendrimères chargés peut être réduite considérablement en modifiant la surface par des entités neutres hydrophiles telles que les Polyéthylène glycol (PEG) ou en les associant à des additifs tels que le sérum de

⁵³ Wiwattanapatapee N. M. R., Klopsch R., Lorenz H., Weener J. W., Meijer E. W., Paulus W. and Duncan R. *J. Controlled Release* **2000**, 65, 133.

⁵⁴ Brazeau G. A., Attia S., Poxon S. and Hughes J. A. *Pharmacol. Res.* **1998**, 15, 680.

veau fœtal. Si les dendrimères (principalement les PAMAM) sont généralement toxiques *in vitro*, ils ne semblent pas toxiques *in vivo*, même jusqu'à des générations élevées (G5) et des concentrations importantes (10 mg/kg en injection), quelle soit la nature de la surface dendritique⁵⁵.

L'aspect immunogène des dendrimères a été étudié et il a été montré que les dendrimères PAMAM aux extrémités amines sont immunogènes mais que la modification de la surface par les chaînes de polyéthylène glycol (PEG) permet de réduire l'immunogénécité et d'allonger le temps de vie du dendrimère dans la circulation sanguine⁵⁶. Les chaînes PEG augmentent le caractère hydrophile du dendrimère et créent une surface hautement hydratée avec très peu de perturbations vis-à-vis de l'environnement physiologique. Dans un but totalement inverse, le dendrimère peut également être couplé à des antigènes ou à des épitopes des cellules CD4+ pour créer des composés hautement immunogènes.

La bioperméabilité des dendrimères a été étudiée surtout dans le cadre de son utilisation dans le domaine de la transfection. Les dendrimères complexés à l'ADN peuvent rentrer dans le noyau cellulaire avec peu de dommage membranaire et de cytotoxicité. Des études de transfection *in vitro* ont montré que l'addition d'une quantité modérée de sulfonate de α -cyclodextrines améliore la capacité de transfection du complexe PAMAM-ADN⁵⁷. Dans le cas des dendrimères polylysine, l'efficacité de la transfection est nettement améliorée par la modification de la surface par les chaînes PEG. Néanmoins, le taux de transfection reste globalement bas à cause des problèmes de libération de l'ADN dans le noyau⁵⁸. La forme sphérique des dendrimères n'est en réalité pas très adaptée pour la transfection, il a été montré par ailleurs que les dendrimères PAMAM "fragmentés" possèdent une meilleure capacité de transfection par rapport à la forme "complète"⁵⁹. Afin d'utiliser les dendrimères pour la

⁵⁵ Roberts J. C., Bhalgat M. K. and Zera R. T. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. **1996**, 30, 53.

⁵⁶ Kobayashi H., Kawamoto S., Saga T., Sato N., Hiraga A., Ishimori T., Konishi J., Togashi K. and Brechbiel M. W. *Magn. Reson. Med.* **2001**, 46, 781.

⁵⁷ Roessler B. J., Bielinska A. U., Janczak K., Lee I. and Baker J. R. Jr. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 283, 124.

⁵⁸ Mannistö M., Vanderkerken S., Toncheva V., Elomaa M., Ruponen M., Schacht E. and Urtti A. *J. Controlled Release* **2002**, 83, 169.

⁵⁹ Tang M. X., Redemann C. T. and Szoka F. C. Jr. *Bioconjugate Chem.* **1996**, 7, 703.

délivrance des médicaments, leur bioperméabilité au niveau macroscopique doit également être prise en compte. Les études *in vivo* des dendrimères PAMAM polycationiques (G1-G4) au travers de l'endothélium microvasculaire indiquent que le temps d'extravasation augmente avec l'augmentation des générations et du poids moléculaire du dendrimère⁶⁰. Les études sur le transport transépithélial des dendrimères PAMAM (G0-G4) dans une lignée de cellules de rein de chien (Mardin-Darby canine kidney cells ou encore MDCK) ont montré que la génération 4 possède la meilleure perméabilité, néanmoins, aucune corrélation entre la perméabilité et la génération n'a été prouvée⁶¹.

1.2 Dendrimères fluorescents et leurs applications en biologie

Nous avons parlé précédemment des avantages des dendrimères comme étant multivalents, biocompatibles, parfaitement définis et contrôlables en structure et en taille et surtout maniables et adaptables selon les besoins. Toutes ces caractéristiques rendent les dendrimères particulièrement prometteurs pour les applications en biotechnologie.

Les sondes fluorescentes sont souvent utilisées pour explorer des systèmes biologiques car elles permettent de produire une visualisation directe des événements cellulaires ou moléculaires *in vitro* ou *in vivo*. Malheureusement ces sondes fluorescentes classiques telles que des anticorps marqués ne permettent pas toujours de fournir des résultats satisfaisants. En effet, un seul fluorophore est généralement conjugué à un anticorps, l'intensité de fluorescence dans certains cas peut s'avérer insuffisante. De plus le caractère souvent hydrophobe des fluorophores pose parfois des problèmes d'agrégation des anticorps dans les milieux aqueux sans parler des difficultés et du risque de dénaturation des entités biologiques lors du couplage⁶². Les dendrimères offrent la possibilité de regrouper des fluorophores, des motifs hydrophiles et des agents de ciblage (anticorps ou ligand) en une seule entité multifonctionnelle⁴² qui permet d'améliorer la sensibilité, la spécificité et la solubilité des

⁶⁰ Sayed M. E., Kiani M. F., Naimark M. D., Hikal A. H. and Ghandehari H. *Pharm. Res.* **2001**, *18*, 23.

⁶¹ Tajarobi F., Sayed M. E., Rege B. D., Polli J. E. and Ghandehari H. *Int. J. Pharm.* **2001**, *215*, 263.

⁶² Ong K. K., Jenkins A. L., Cheng R., Tomalia D. A., Durst H. D., Jensen J. L., Emanuel P. A., Swim C. R. and Yin R. *Analytica Chimica Acta* **2001**, *444*, 143.

sondes fluorescentes (cf. Figure 1-17). Il arrive parfois que le marqueur fluorescent ne soit pas suffisamment soluble ou stable dans les milieux aqueux, le fait de l'encapsuler dans des couches dendritiques permet de l'isoler de l'environnement extérieur défavorable et de préserver ainsi la fluorescence^{63,64}.

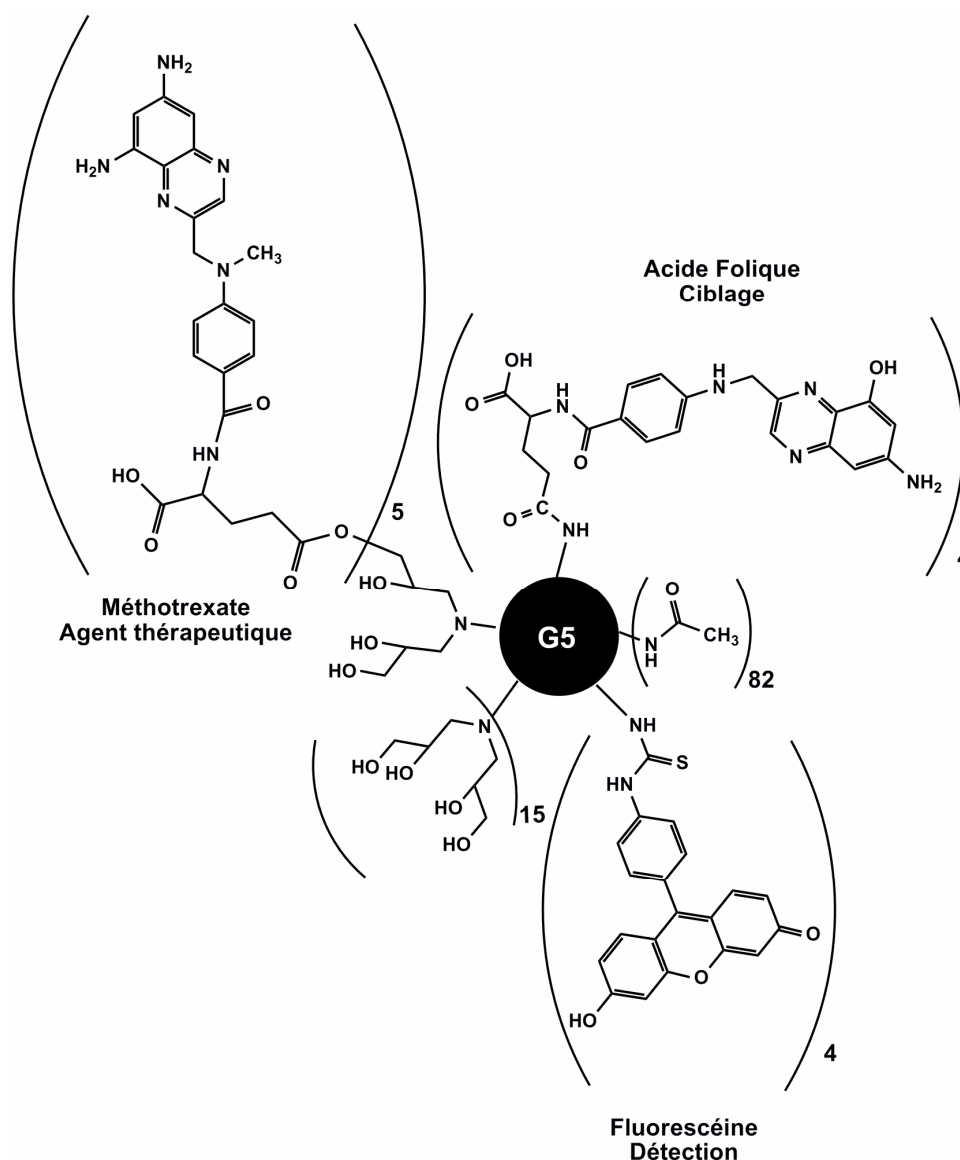


Figure 1-17 : Représentation d'un dendrimère PAMAM de 5^{ème} génération regroupant des agents de ciblage, des agents thérapeutiques et des fluorophores⁶⁵

⁶³ Yin M. Z., Kuhlmann C. R. W., Sorokina K., Li C., Mihov G., Pietrowski E. Koykov K., Klapper M., Luhmann H. J., Müllen K. and Weil T. *Biomacromolecules* **2008**, 9, 1381.

⁶⁴ Yin M., Shen J., Pflugfelder G. O. and Müllen K. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 7806.

⁶⁵ Thomas T. P., Majoros I. J., Kotlyar A., Kukowska-Latallo J F., Bielinska A., Myc A. and Baker Jr J. R. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3729.

L'utilisation des dendrimères en transfection, en nano-médecine pour la délivrance de médicaments ou encore directement comme agent thérapeutique est en pleine expansion, cependant, beaucoup d'éléments tels que leur mécanisme d'action, leur localisation dans les différents systèmes biologiques, leur interaction avec les cellules, les aspects pharmacocinétiques ont besoin d'être élucidés. Les dendrimères fluorescents peuvent permettre justement de résoudre ces problèmes en offrant une visualisation directe de différents phénomènes.

Les dendrimères fluorescents peuvent également constituer ou du moins participer à la construction des biocapteurs pour détecter la présence des biomolécules *via* l'activation ou la désactivation de la fluorescence lors des interactions biomolécules-dendrimères^{66,67}. Dans une moindre mesure, les dendrimères fluorescents ont aussi été combinés à des nanotubes ou des nanoparticules inorganiques dans le but d'améliorer la biocompatibilité de ces derniers, de les protéger de l'environnement extérieur et de les rendre "visibles"^{68,69}.

1.2.1 Dendrimères poly(amidoamine)-PAMAM comme plateforme

1.2.1.1 Internalisation et localisation intracellulaire

Les dendrimères PAMAM sont des macromolécules dendritiques les plus utilisées à l'heure actuelle en nano-médecine et en particulier pour la délivrance des médicaments et la transfection, grâce à leur commercialisation à l'échelle industrielle depuis 1992 par la société Dendritech. Inc⁷⁰. De nombreuses études ont montré que la conjugaison des dendrimères PAMAM à des principes actifs ayant de faibles biodisponibilités permet d'améliorer la solubilité de ces médicaments et la perméabilité de ces derniers au travers des monocouches

⁶⁶ Park C. Im M. S., Lee S., Lim J. and Kim C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 9922.

⁶⁷ Trinchi A. and Muster T. H. *Supramolecular chemistry* **2007**, 19, 431.

⁶⁸ Shi X. Y., Wang S. H., Shen M. *Abstracts of Papers, 237th ACS National Meeting, Salt Lake City, UT, United States*, March 22-26, **2009**, American Chemical Society, Washington, D. C

⁶⁹ Shi X. Y., Wang S. H., Meshinchi S., Van Antwerp M. E., Bi X. D., Lee Y. H. and Baker J. R. Jr. *Small* **2007**, 1245.

⁷⁰ www.dendritech.com

cellulaires. D'autres publications ont rapporté que la modification de surface des dendrimères peut provoquer des changements significatifs dans leurs propriétés biologiques telles que la cytotoxicité et la capacité à traverser les monocouches cellulaires^{71,72}. Par exemple, le couplage des molécules de fluorescéine isothiocyanate (FITC) au dendrimère PAMAM cationique de 4^{ème} génération G4 à un rapport de 8/1 conduit à une diminution de cytotoxicité du dendrimère et une augmentation significative de sa capacité à traverser les monocouches de cellules Caco-2⁷² (lignée cellulaire dérivée d'un carcinome humain du côlon.). Néanmoins, si les modifications de surface permettent d'améliorer la perméation des dendrimères, il y a en revanche peu de données concernant l'influence précise de ces modifications sur le mécanisme de l'internalisation des dendrimères dans les cellules et sur le trafic intracellulaire. D'Emanuele *et coll.* se sont particulièrement intéressés à l'internalisation des dendrimères par la voie d'endocytose et ont étudié l'effet de la modification de surface des dendrimères PAMAM par des groupements lauryl et/ou propranolol (un médicament de la famille des -bloquants) sur le mécanisme de l'internalisation des dendrimères dans les cellules HT-29 (lignée cellulaire de carcinomes humain du côlon) capables d'effectuer l'endocytose⁷³. Afin d'étudier la vitesse de l'internalisation des dendrimères PAMAM par la cytométrie de flux et de visualiser la localisation subcellulaire de ces derniers, les dendrimères PAMAM ont été couplés à la fluorescéine-isothiocyanate (FITC) à un rapport moyen de 1/1 *via* les extrémités amines restantes des dendrimères.

D'Emanuele *et coll.* ont analysé l'effet de la modification de surfaces sur la vitesse de l'internalisation des dendrimères-FITC dans les cellules HT-29 par la cytométrie de flux et ont trouvé que, par rapport à la vitesse de l'internalisation des dendrimères non modifiés, la conjugaison de deux groupements lauryl aux dendrimères augmente la vitesse de

⁷¹ a) D'Emanuele A., Jevprasesphant R., Penny J. and Attwood D. *J. Controlled Release* **2004**, 95, 447. ; b) Jevprasesphant R., Penny J., Jalal R., Attwood D., McKeown N. B. and D'Emanuele A. *Int. J. Pharm.* **2003**, 252, 263. c) Jevprasesphant R., Penny J., Attwood D., McKeown N. B. and D'Emanuele A. *Pharm. Res.* **2003**, 20, 1543.

⁷² a) Kitchens K. M., Kolhatkar R. B., Swaan P. W., Eddington N. D. and Ghandehari H. *Pharm. Res.* **2006**, 23, 2818. b) Kolhatkar R. B., Kitchens K. M., Swaan P. W. and Ghandehari H. *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 2054.

⁷³ Saovapakhiran A., D'Emanuele A., Attwood D. and Penny J. *Bioconjugate chem* (Web) **09 March 2009**

l'internalisation de manière significative (x 2) tandis que la conjugaison de deux molécules de propranolol aux dendrimères diminue considérablement la vitesse de l'internalisation (/ 2).

L'incubation des dendrimères PAMAM fluorescents avec les cellules HT-29 en présence des marqueurs de différents organites ont permis de mettre en évidence la localisation subcellulaire des dendrimères (cf. Figure 1-18). La clathrine et la caveoline sont des marqueurs de l'endocytose, la transferrine un marqueur de l'endosome et le Lysotracker® un marqueur du lysosome. La colocalisation des dendrimères fluorescents qu'ils soient modifiés ou pas avec la clathrine ou la caveoline a confirmé la présence des dendrimères dans la membrane plasmique et dans le cytoplasme. La colocalisation des dendrimères avec la transferrine a permis de conclure que tous les dendrimères ont été internalisés par l'endocytose. Enfin, la colocalisation des dendrimères avec le Lysotracker® a révélé le trafic des dendrimères vers le lysosome, un organite acide riche en enzymes hydrolytiques. Ces résultats concordent avec une étude précédente réalisée sur les cellules Caco-2⁷⁴. Cependant, des études de colocalisation semi-quantitatives réalisées par D'Emanuele *et coll.* ont montré une accumulation significativement moins importante dans le lysosome pour les dendrimères couplés aux groupements lauryl ou propranolol que pour les dendrimères non modifiés. Des études plus approfondies de la relation entre la surface des dendrimères et leur accumulation dans le lysosome s'avèrent ainsi importantes lorsque ces derniers sont utilisés pour la délivrance des médicaments via des liaisons sensibles aux hydrolases acides, car une bonne connaissance de cette relation permettrait une libération de médicaments contrôlée.

⁷⁴ Kitchens K. M., Foraker A. B., Kolhatkar R. B., Swaan P. W. and Ghandehari H. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 2138.

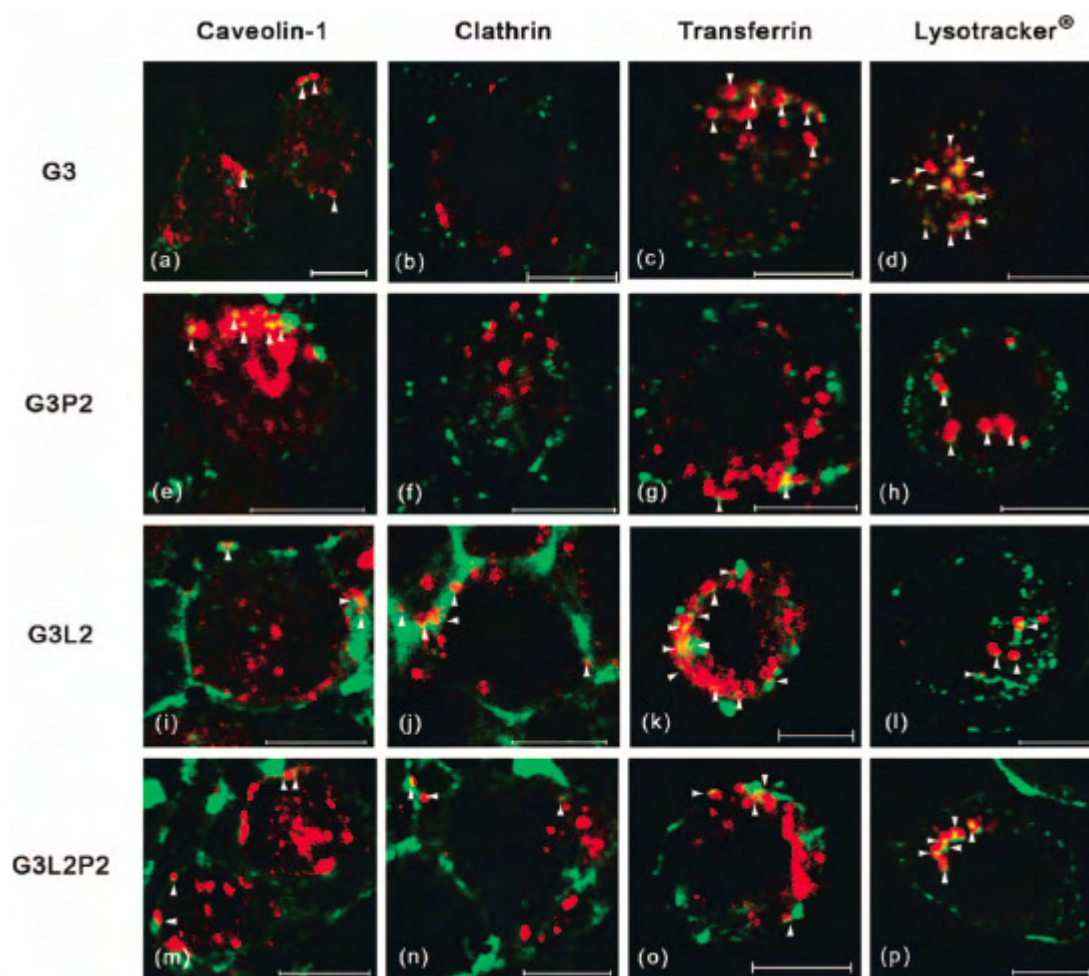


Figure 1-18 : Localisation intracellulaire des dendrimères PAMAM G3-FITC dans les cellules HT-29, en présence de cavérine-1, clathrine, transferrine ou lysotracker^{®73}

Dans la même idée que D'Emanuele *et coll.*, mais d'une manière différente, Kannan *et coll.* ont étudié l'effet des fonctions de surface des dendrimères PAMAM (G4-OH, G4-NH₂ et G4-COOH) sur le processus de l'internalisation de ces dendrimères dans les cellules A549 (lignée cellulaire du cancer du poumon humain) grâce aux dendrimères marqués à la fluorescéine⁷⁵. Les vitesses de l'internalisation de ces trois types de dendrimères ont été déterminées par la cytométrie de flux et ont montré que l'internalisation se fait très rapidement pour les trois types de dendrimères mais avec en tête le dendrimer cationique. Néanmoins, ces vitesses d'internalisation des dendrimères fluorescents peuvent être réduites considérablement en diminuant la température de l'environnement cellulaire (40 à 50 % de réduction pour les dendrimères chargés et presque 70 % de réduction pour le dendrimer neutre). Ce résultat indique que l'internalisation des dendrimères au travers de la membrane

⁷⁵ Pillai O., Inapagolla R., Kannan S. and Kannan R. M. *Biomaterials* **2008**, 29, 3469.

cellulaire se fait *via* un transport actif. Kannan *et coll.* ont donc cherché à savoir par quelle voie d'endocytose se font ces transports membranaires. En mesurant les variations de l'intensité de fluorescence après avoir bloqué successivement les différentes voies d'entocytose par des inhibiteurs spécifiques, ils ont mis en évidence des mécanismes d'internalisation différents selon les surfaces différentes. Tandis que les dendrimères anioniques sont internalisés en partie par la voie d'endocytose dépendante de la cavéoline, les dendrimères cationiques et neutres passent par d'autres voies indépendantes de la clathrine et de la cavéoline. Contrairement aux résultats de D'Emanuele *et coll.*, Kannan *et coll.* n'ont pas observé de dendrimères fluorescents cationiques dans les lysosomes des cellules A549 et ils ont attribué cette contradiction à la différence des lignées cellulaires étudiées, ce qui indique que la localisation des dendrimères fluorescents intracellulaire dépend de la lignée cellulaire (cellules HT-29 dans un cas et cellules A549 dans l'autre) et de la durée d'incubation avec ces cellules. Ces études de la relation surface-internalisation des dendrimères fluorescents ont permis de montrer qu'il est possible de moduler la cinétique d'internalisation intracellulaire des dendrimères et de cibler la délivrance des médicaments dans un compartiment subcellulaire spécifique, en modifiant la surface des dendrimères.

1.2.1.2 Dendrimères PAMAM fluorescents spécifiques

Les dendrimères fluorescents doivent être spécifiques pour pouvoir imager précisément les tissus cancéreux recherchés et pour délivrer correctement des médicaments aux endroits ciblés du système biologique. La spécificité dans les systèmes biologiques est assurée par des processus de reconnaissance de types interaction anticorps-antigène ou interaction ligand-récepteur. Le couplage d'un motif capable de reconnaître ou d'être reconnu aux dendrimères fluorescents permet de rendre ces derniers capables de cibler les cellules à imager et/ou à guérir.

Tomalia *et coll.* ont conjugué un dendrimère PAMAM de 5^{ème} génération (G5) couplé à la fluorescéine à un anticorps anti-toxine botulique (toxine responsable de la maladie paralytique rare, le botulisme, et sécrétée par l'espèce bactérienne *costridium botulinum*) et se sont intéressés à l'influence du dendrimère fluorescent sur la spécificité de l'anticorps

vis-à-vis de l'antigène anatoxine botulique (version atténuée de la toxine botulique) *in vitro*⁶². Ils ont montré que les dendrimères fluorescents couplés à l'anticorps ne s'agrègent pas en solution aqueuse (tampon phosphate à pH 7,4), contrairement à l'anticorps directement couplé à la fluorescéine, et que la présence du dendrimère fluorescent sur l'anticorps n'affecte pas la spécificité de ce dernier pour l'anatoxine botulique. En effet les dendrimères fluorescents conjugués à l'anticorps qui sont initialement solubilisés dans le tampon phosphate forment des clusters lumineux autour des anatoxines botuliques lorsque celles-ci sont ajoutées à la solution. De plus, par la mesure des intensités lumineuses, Tomalia *et coll.* ont conclu que l'utilisation du dendrimère fluorescent améliore l'intensité de fluorescence par rapport au conjugué simple anticorps-fluorescéine correspondant (cf. Figure 1-19).

Quintana *et coll.* ont conçu un nano-objet intelligent basé sur le dendrimère PAMAM fluorescent multifonctionnel possédant l'acide folique et le méthotrexate⁷⁶, Den-FITC-FA-MTX. L'acide folique se lie avec une très forte affinité à son récepteur FOLR surexprimé chez de nombreuses cellules cancéreuses humaines. Le méthotrexate (MTX) est une molécule utilisée dans le traitement de certains cancers et dans les maladies auto-immunes. Il inhibe la synthèse de l'ADN en inhibant la dihydrofolate réductase, une enzyme capitale dans le métabolisme de l'acide folique. La conjugaison directe de l'acide folique au méthotrexate comme à d'autres biomolécules actives conduit souvent à la perte de la capacité de ciblage. L'utilisation d'un dendrimère PAMAM fluorescent comme plateforme a permis d'associer l'agent de ciblage, l'acide folique, à la molécule active le méthotrexate sans perte de spécificité et d'améliorer l'efficacité de ce traitement anticancéreux *in vitro*. Par la cytométrie de flux, Quintana *et coll.* ont pu mettre en évidence l'internalisation spécifique des dendrimères fluorescents possédant l'acide folique et/ou MTX dans les cellules KB (lignée cellulaire du cancer de l'épidermoïde humain surexprimant les récepteurs de l'acide folique, en particulier si elle est cultivée dans un milieu pauvre en acide folique⁷⁷), alors que les dendrimères fluorescents sans marqueur acide folique ne sont que très peu endocytés. De

⁷⁶ Quintana A., Raczka E., Piehler L., Lee I., Myc A., Majoros I., Patri A. K., Thomas T., Mule J. and Baker J. R. Jr. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1310.

⁷⁷ Kukowska-Latallo J. F., Bielinska A., Johnson J., Spindler R., Tomalia D. A. and Baker J. Jr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1996**, *93*, 4897.

plus, le Den-FITC-FA-MTX, lorsque le MTX est conjugué par une liaison ester, est 4 fois plus efficace pour induire la cytotoxicité chez les cellules KB que le méthotrexate seul (cf. Figure 1-20).

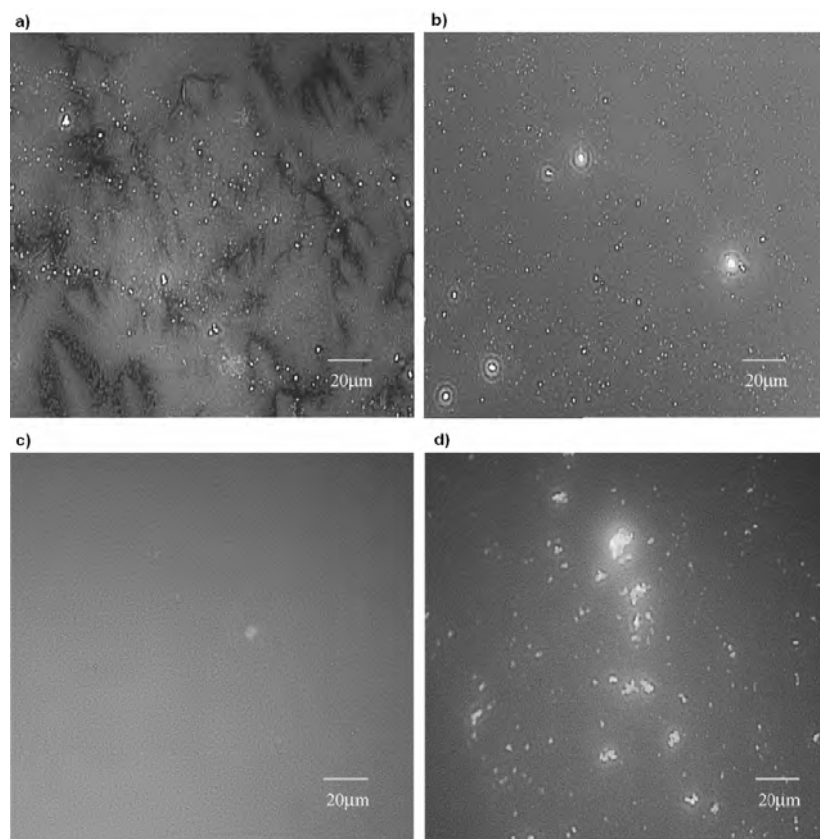


Figure 1-19 : Microscopie à fluorescence des anticorps fluorescents en absence et en présence de l'anatoxine botulique : a) anticorps-fluorescéine dans le tampon phosphate ; b) anticorps-fluorescéine en présence de l'anatoxine botulique ; c) anticorps-dendrimère-fluorescéine dans le tampon phosphate ; d) anticorps-dendrimère-fluorescéine en présence de l'anatoxine botulique⁶²

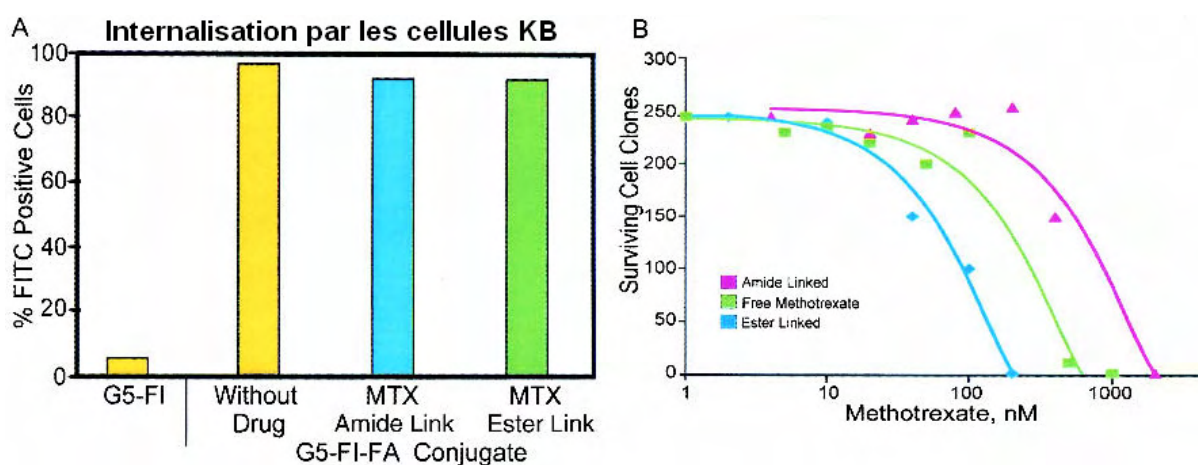


Figure 1-20 : Etude de la délivrance intracellulaire de méthotrexate par la cytométrie de flux⁷⁶

Myc *et coll.* ont confirmé dans leurs études le potentiel qu'a un dendrimère fluorescent conjugué à effectuer la délivrance de médicaments ciblée⁷⁸. Ils ont réussi à cibler les cellules KB surexprimant les récepteurs de l'acide folique de manière spécifique et à en induire l'apoptose (suicide cellulaire) grâce au dendrimère-FITC-FA-BH3 (BH3 pour Bcl-2 homology 3 qui est un agent capable d'induire l'apoptose d'une cellule⁷⁹).

Parfois, les dendrimères fluorescents spécifiques sont utilisés pour fonctionnaliser des nanoparticules magnétiques afin d'apporter la visibilité, la spécificité et la protection à ces dernières⁸⁰. Wang *et coll.* ont démontré la faisabilité de la fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer par des dendrimères PAMAM fluorescents spécifiques, Den-FITC-FA (cf. Figure 1-21), et la capacité de ces nanoparticules fonctionnalisées à cibler les cellules KB *in vitro*⁸⁰.

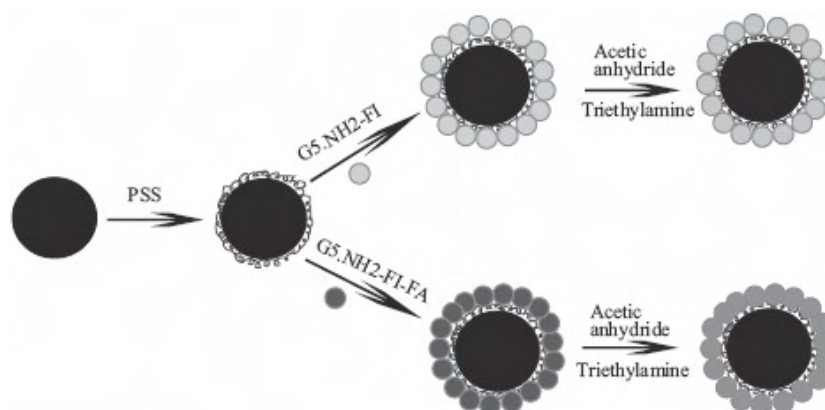


Figure 1-21 : Représentation schématique de la fonctionnalisation des nanoparticules de fer d'oxyde par les dendrimères G5-Fluorecétine⁸⁰

1.2.1.3 Dendrimères PAMAM fluorescents en imagerie *in vivo*

Un système VEGF-¹⁰B-Den-Cy5 fluorescent capable de cibler les récepteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF pour Vascular Endothelial growth

⁷⁸ Myc A., Patri A. K. and Baker J. R. Jr. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 2986

⁷⁹ a) Yang E., Korsmeyer S. J. *Blood* **1996**, 88, 386 ; b) Hirotsu M., Zhang Y., Fujita N., Naito M. and Tsuruo T. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 20415 ; c) Zhou X. M., Liu Y., Payne G., Lutz R. J. and Chittenden T. J. *Biol. Chem.* **2000**, 275, 25046.

⁸⁰ Wang S. H., Shi X. Y., Antwerp M. V., Cao Z. Y., Swanson S. D., Bi X. D. and Baker J. R. Jr. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, 17, 3043.

factor en anglais) surexprimés sur les cellules de l'angiogenèse tumorale a été synthétisé par Backer *et coll.*⁸¹. Ce système possède à la fois des groupements contenant du bore-10 pour pouvoir effectuer la thérapie par capture de neutrons (Boron Neutron Capture Therapy ou BNCT) et des groupements fluorescents pour pouvoir effectuer l'analyse *in vivo* (cf. Figure 1-22). La thérapie par capture de neutrons est basée sur la délivrance sélective de bore-10 aux cellules tumorales^{82,83}. L'irradiation provoquée par des neutrons de basse énergie produit des particules de He^{2+} et de Li^{3+} qui sont des particules de haute énergie mais qui ne se déplacent que de 5 à 10 μm . Ainsi seules les cellules qui sont liées au bore-10 ou qui en contiennent sont tuées par la thérapie. L'analyse *in vivo* de la capacité de ciblage de ce système paraît importante et a pu être réalisée par imagerie grâce aux dendrimères fluorescents conjugués. Les images de microscopie de fluorescence ont permis de confirmer la spécificité du système.

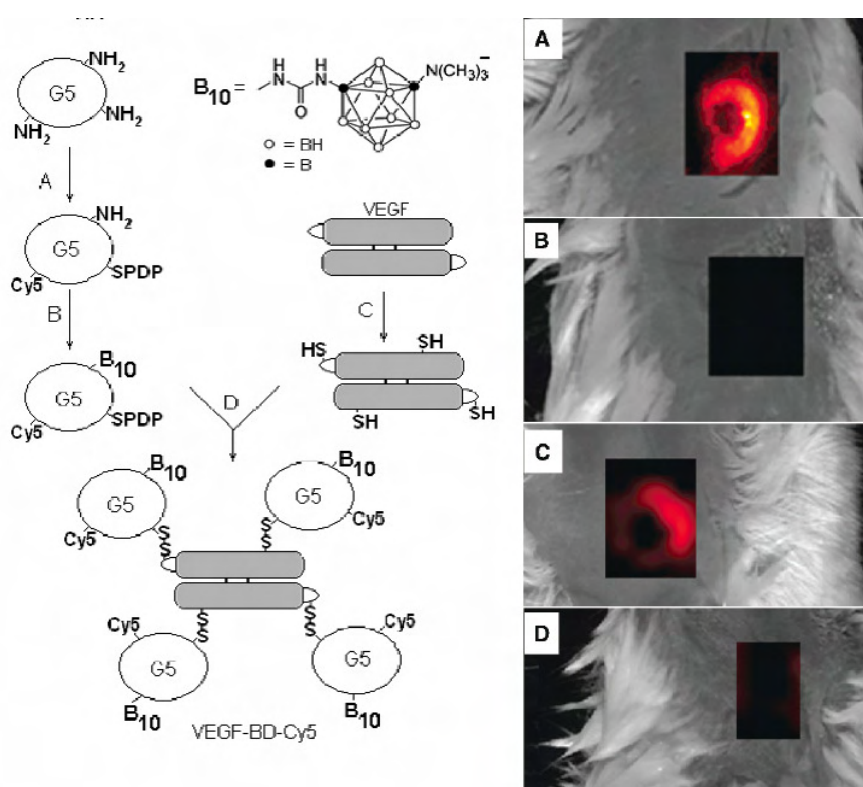


Figure 1-22 : Synthèse multi-étape du système VEGF- ^{10}B -Den-Cy5⁸¹ (gauche) et l'imagerie *in vivo* du tissu tumoral ciblé (droite) : A) et C) en présence du système VEGF- ^{10}B -Den-Cy5 ; B) en présence de ^{10}B -Den-Cy5 ; D) souris prétraitée avec VEGF.

⁸¹ Backer M. V., Gaynutdinov T. I., Patel V., Bandyopadhyaya A. K., Thirumamagal B. T. S., Tjarks W., Barth R. F., Claffey K. and Backer J. M. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, 4, 1423.

⁸² Barth R. F., Coderre J. A., Vicente M. G. H. and Blue T. E. *Clin. Cancer Res.* **2005**, 11, 3987.

⁸³ Soloway A. H., Tjarks W., Barnum B. A. *et al. Chem Rev.* **1998**, 98, 1515.

La fluorescence du dendrimère est fortement affectée par le nombre de fluorophores conjugués à sa surface. Wängler *et coll.* se sont intéressés à l'influence du nombre de différents fluorophores à la surface du dendrimère PAMAM sur la propriété fluorescente de l'ensemble dendritique⁸⁴. Ils ont montré que l'augmentation du nombre de groupements dansyl (16 contre 1 par dendrimère) à la surface du dendrimère améliore nettement l'intensité fluorescente du dendrimère et offre une meilleure image en microscopie de fluorescence en présence des cellules ciblées. En revanche, cette amélioration de fluorescence par augmentation du nombre de fluorophores à la surface du dendrimère n'est pas systématique. Au contraire, l'augmentation du nombre de fluorophores comme la fluorescéine ou la coumarine à la surface a tendance à diminuer la fluorescence du dendrimère, à cause probablement de l'auto-désactivation (self-quenching en anglais) de ces fluorophores qui ont des déplacements de Stocks relativement courts et qui sont très proches les uns des autres à la surface du dendrimère^{84,85}. Par conséquent, ce phénomène est à prendre en considération lors de la conception d'un outil fluorescent dendritique pour l'imagerie *in vivo*.

L'imagerie *in vivo* a été longtemps et est toujours dominée par les techniques de tomographie basée soit sur les rayons X (radiologie conventionnelle, tomodensitomètre ou CT-scan, angiographie...), soit sur la résonance magnétique (IRM). Ces méthodes conventionnelles sont généralement monochromes et sont capables de détecter un seul agent de contraste à la fois, ce qui donne des informations incomplètes. La conception d'un agent de contraste multimodal devient dans ce cas intéressante. Kobayashi *et coll.* ont construit une série d'agents de contraste nanométriques avec quasiment des caractéristiques chimiques identiques⁸⁶. Ces agents d'imagerie contiennent tous 120 radioisotopes stabilisés et 4 fluorophores Alexa Fluor afin d'offrir le potentiel pour l'imagerie multimodale et une résolution multicolore (cf. Figure 1-23). L'imagerie par radioisotope fournit des informations semi-quantitatives tandis que l'imagerie de fluorescence donne des informations

⁸⁴ Wängler C., Moldenhauer G., Saffrich R., Knapp E.-M., Beijer B., Schnölzer M., Wängler B., Eisenhut M., Haberkorn U. and Mier W. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 8116.

⁸⁵ Mahmood U. and Weissleder R. *Mol. Cancer. Ther.* **2003**, *2*, 489.

⁸⁶ Kobayashi H., Koyama Y., Barrett T., Hama Y., Regino C. A. S., Shin I. S., Jang B.-S., Le N., Paik C. H., Choyke P. L. and Urano Y. *ACS Nano* **2007**, *1*, 258

qualitatives pour les différents compartiments du système lymphatique, avec une excellente résolution spatiale.

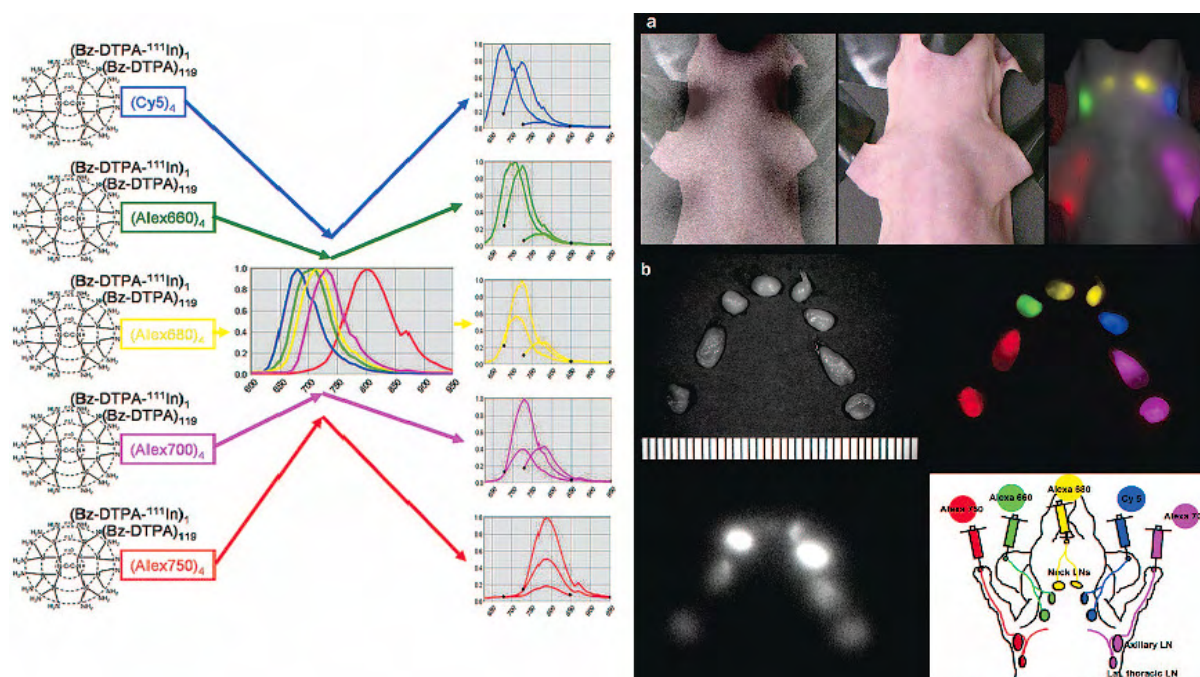


Figure 1-23 : Dendrimères fluorescents multimodaux et leur imagerie multicolore *in vivo*⁸⁶

1.2.2 Dendrimères ayant un fluorophore au cœur et leurs applications en biologie

Si les dendrimères PAMAM sont quasiment exclusivement exploités pour la multifonctionnalité de la surface, du fait qu'ils sont commercialisés et utilisés tels quels, d'autres types de dendrimères peuvent être modulés à différents niveaux : le cœur, les branches et la surface.

Le fait d'encapsuler le fluorophore au cœur du dendrimère réduit le nombre de fluorophores par dendrimère à un rapport de 1, ce qui semble contraire à l'objectif d'augmenter l'intensité de fluorescence. Cependant, cette encapsulation permet d'isoler le fluorophore de l'environnement extérieur qui a souvent tendance à désactiver la fluorescence par transfert d'énergie, par transfert d'électron, par réaction chimique ou tout simplement par l'insolubilité du fluorophore dans le solvant. Cette protection permet de préserver la fluorescence, d'utiliser un fluorophore hydrophobe⁶³ en milieux aqueux et parfois

d'augmenter la stabilité du fluorophore. La modification de la nature et de l'épaisseur de cette enveloppe protectrice influence fortement sur les propriétés fluorescentes du dendrimère, ce qui offre un panel d'applications potentielles.

1.2.2.1 Biocapteurs

Bien que les interactions hautement spécifiques soient très répandues dans la nature, il est difficile de concevoir des molécules artificielles qui présentent une telle interaction pour des biocapteurs (ou biosensor en anglais)⁸⁷. Une alternative consiste en la conception d'un grand nombre de récepteurs moins spécifiques mais qui fournissent des interactions différentielles suivant les ligands⁸⁸. Les variations dans les réponses pourraient donc être utilisées pour générer des modèles spécifiques aux ligands. Pour cette raison, Jiwanich *et coll.* ont synthétisé des dendrimères (ou dendrons) de différentes générations de type poly(aryl éther) possédant un groupement anthracène au cœur⁸⁹ (cf. Figure 1-24), dans le but d'étudier l'influence de la génération (donc l'épaisseur de l'enveloppe) sur les interactions dendrimères-métalloprotéine. En effet, une interaction dendrimère-métalloprotéine se traduit directement par une désactivation partielle ou complète de la fluorescence provenant du cœur, du fait de la présence des atomes métalliques. La capacité d'un dendrimère à interagir avec une métalloprotéine peut donc être mesurée à travers la diminution de fluorescence en fonction de la concentration en métalloprotéine⁹⁰. Pour chaque génération de dendrimère, une constante de désactivation de Stern-Volmer K_{SV} a été obtenue à partir de l'interpolation

⁸⁷ a) McQuade D. T., Pullen A. E. and Swager T. M. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2537 ; b) Sessler J. L., Lawrence C. M. and Jayawickramarajah J. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 314 ; c) Basabe-Desmonts L., Reinhoudt D. N. and Crego-Calama M. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 993.

⁸⁸ a) Wright A. T. and Anslyn E. V. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 14 ; b) Albert K. J., Lewis N. S., Schauer C. L., Sotzing G. A., Stizel S. E., Vaid T. P. and Walt D. R. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2595 ; c) Baldini L., Wilson A. J., Hong J. and Hamilton A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 5656 ; d) You C.-C., Miranda O. R., Gider B., Ghosh P. S., Kim I.-B., Erdogan B., Krovi S. A., Bunz U. H. F. and Rotello V. M. *Nature Nanotechnology* **2007**, 2, 318.

⁸⁹ Jiwanich S., Sandanaraj S. and Thayumanavan S. *Chem. Commun.* **2009**, 806.

⁹⁰ Wang D., Gong X., Heeger P. S., Rininsland F., Bazan G.C. and Heeger A. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 49 ; b) Kim I. B., Dunkhorst A. and Bunz U. H. F. *Langmuir* **2005**, 21, 7985 ; Wang J. Wang D., Miller E. K., Moses D., Bazan G. C. and Heeger A. J. *Macromolecules* **2000**, 33, 5153 ; d) Wilson J. N., Wang Y., Lavigne J. J. and Bunz U. H. F. *Chem. Commun.* **2003**, 1626 ; e) Chen L., McBranch D. W., Wang H.-L., Helgeson R., Wudl F. and Whitten D. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96, 12287.

linéaire et exponentielle des tracés expérimentaux, rapport d'intensité de fluorescence (I/I_0) en fonction de la concentration en protéine. Pour trois métalloprotéines différentes, le cytochrome c, la myoglobine et l'hémoglobine, une variation de valeur de K_{SV} en fonction de la génération du dendrimère a été observée. La variation de la fluorescence de ce dendrimère est donc dépendante de la concentration en métalloprotéine et de la génération. Cette propriété rend ce type de dendrimère susceptible d'être exploité en tant que capteur et en particulier dans le domaine biologique.

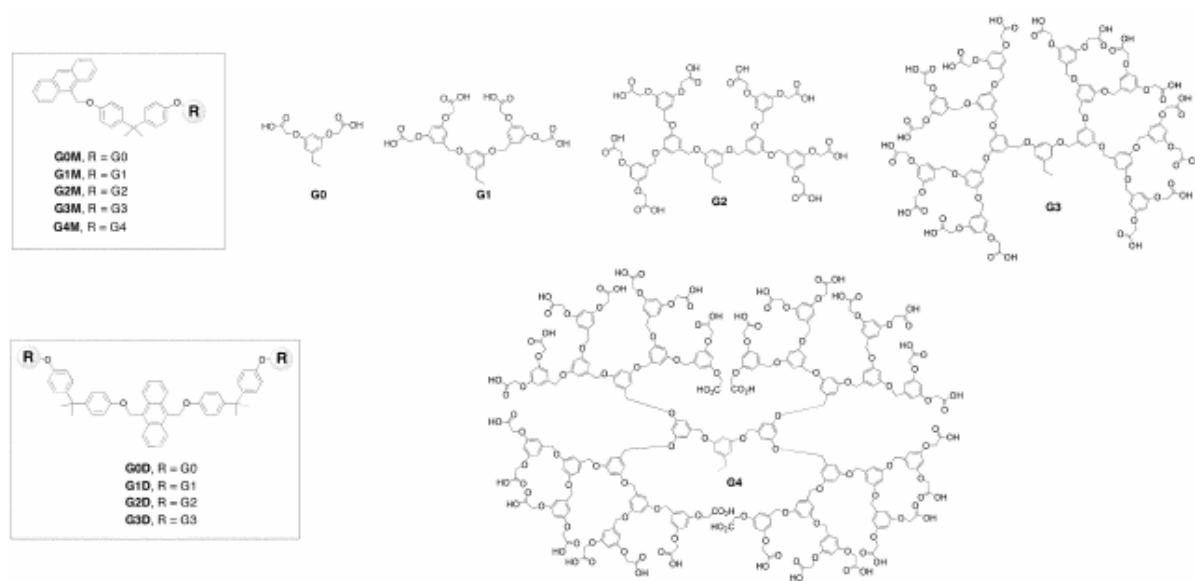


Figure 1-24 : Dendrimères poly(aryl éther) possédant un anthracène au cœur⁸⁹

Des études effectuées par Matos *et coll.* constituent également une preuve de l'existence d'une relation dépendante entre la désactivation de la fluorescence au cœur d'un dendrimère et les interactions biomolécules-dendrimère. Pour cela, deux séries de dendrimères possédant au cœur respectivement une porphyrine liée à un atome de Zn et une porphyrine non liée (cf. Figure 1-25) ont été synthétisées et étudiées avec trois différentes biomolécules dont le benzimidazole qui est un composé impliqué dans la coordination de l'atome de cuivre dans la vitamine B12. Ils ont montré que le processus de désactivation de la fluorescence au cœur du dendrimère dépend non seulement de l'épaisseur de l'enveloppe, donc du nombre de générations, mais également de la nature de la structure dendritique et du mécanisme d'interaction.⁹¹

⁹¹ Matos M. S., Hofkens J. and Gehlen M. H. *J. Fluoresc.* **2008**, *18*, 821.

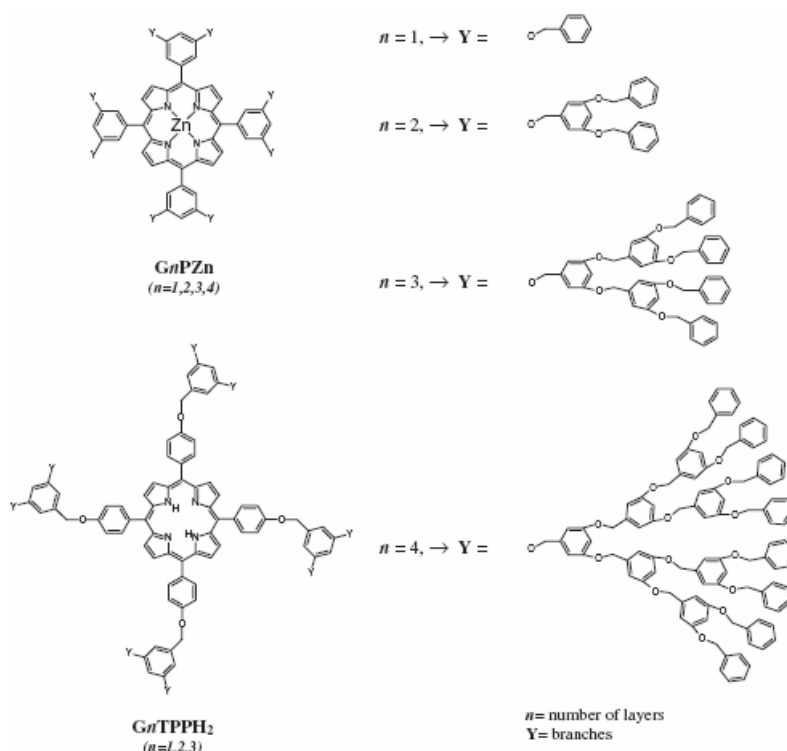


Figure 1-25 : Dendrimères poly(aryl éther) possédant une porphyrine au cœur⁹¹

Une méthode d'auto-assemblage de nanotubes pour application en "biosensing" à partir d'un dendron fluorescent et de la cyclodextrine a été rapportée par Park *et coll.*⁶⁶. Les dendrons amide possédant un motif pyrène s'auto-organisent en vésicule dans une solution aqueuse. Lorsque la cyclodextrine est ajoutée à la solution de vésicules, les groupements pyrène se mettent dans les cavités des molécules de cyclodextrine, transformant ainsi les vésicules en nanotubes couverts de cyclodextrines^{92,66} (cf. Figure 1-26). Les groupements fonctionnels orientés vers l'extérieur des cyclodextrines peuvent être modifiés selon les besoins pour interagir avec différents ligands biologiques. Les propriétés optiques des pyrènes à l'intérieur du nanotube varient fortement avec les interactions produites à la surface, ce qui rend ce type d'assemblage utilisable en tant que biocapteur, par exemple pour détecter la présence d'avidine lorsque les groupements extérieurs de la cyclodextrine sont fonctionnalisés avec la biotine (cf. Figure 1-26).

⁹² Park C., Lee I. H., Lee S., Song Y., Rhue M. and Kim C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 1199.

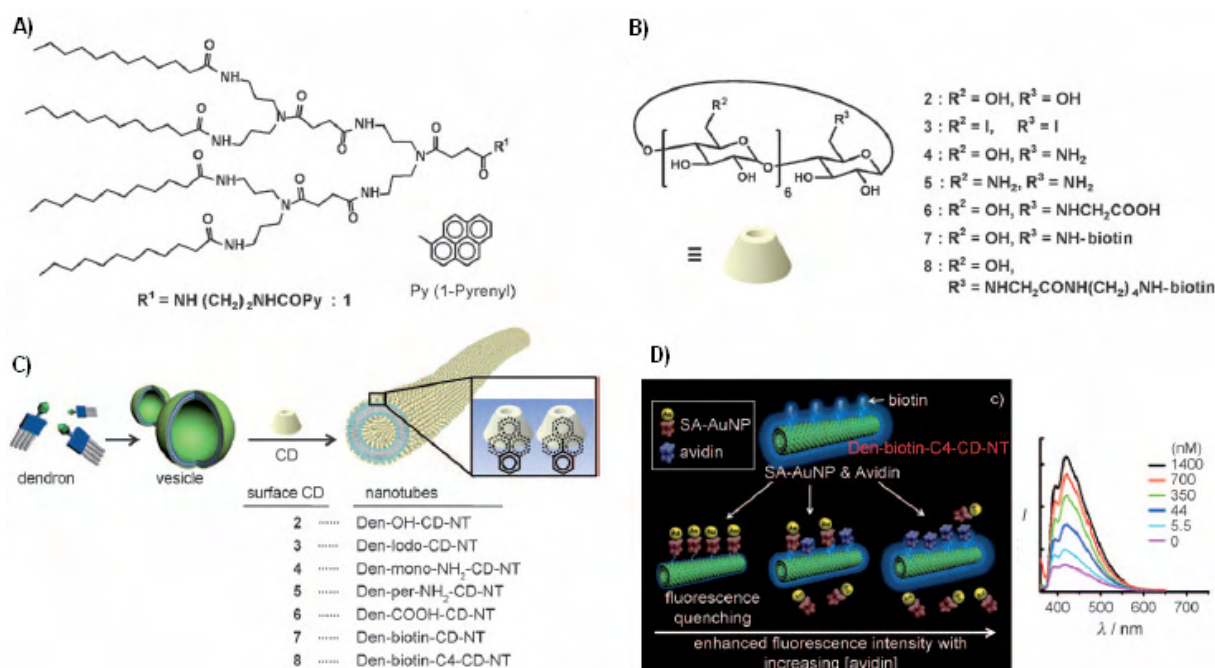


Figure 1-26 : A) Dendron ayant un groupement pyrène au point de branchement ; B) Fonctionnalisations potentielles de la cyclodextrine ; C) Auto-assemblage du nanotube dendritique couvert de cyclodextrine fonctionnalisée ; D) Exemple d'application en capteur de l'avidine⁶⁶

1.2.2.2 Imagerie

Toujours dans l'intérêt de comprendre les processus cellulaires au niveau moléculaire et d'approfondir nos connaissances sur le devenir des macromolécules synthétiques dans les systèmes biologiques, Yin *et coll.* ont synthétisé une nouvelle famille de dendrimères à structure complexe possédant un fluorophore pérylène au cœur qui permet une visualisation de transport cellulaire grâce à la microscopie de fluorescence même au niveau d'une molécule unique⁹³. Le cœur pérylène est entouré de deux couches polymériques différentes⁶³. Une première couche constituée d'une enveloppe polyphénylène dendritique rigide afin de protéger le cœur pérylène de l'environnement aqueux. Une couche extérieure constituée de polymères flexibles sur lesquels différents nombres de charges positives peuvent être introduites afin d'augmenter l'hydrosolubilité et de pouvoir varier la densité de charges (cf. Figure 1-27).

⁹³ Jung C., Müller B. K., Lamb D. C., Nolde F., Müllen K., Bräuchle C. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 5283.

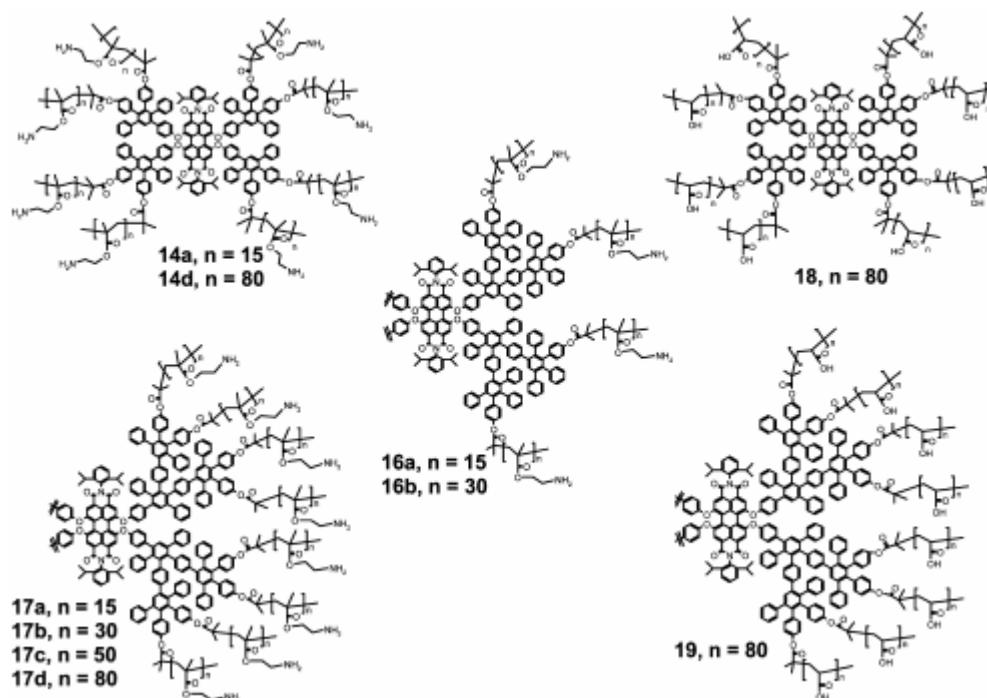


Figure 1-27 : Nouvelle famille de dendrimères complexes ayant un pérylène au cœur⁶³

Le coefficient d'extinction molaire et l'intensité de fluorescence des dendrimères de la série **17** augmentent avec l'augmentation du nombre d'unités répétées dans la couche polymérique, ce qui confirme la capacité protectrice de l'enveloppe. Les tailles de ces particules dendritiques ont été étudiées par la spectroscopie de corrélation de fluorescence (Fluorescence Correlation Spectroscopy en anglais ou FCS), une technique utilisée en biologie cellulaire pour étudier la taille des molécules et leurs propriétés d'agrégation en solution. D'après les résultats de mesures, ces dendrimères ne s'agrègent pas en solution aqueuse à l'exception du **17d**.

Il a été montré précédemment que les dendrimères polycationiques sont rapidement internalisés par les cellules mais sont également hautement toxiques dû à la destruction membranaire causée par les charges positives⁹⁴. En combinant les chaînes polymériques hydrophiles et des charges positives à des proportions adéquates, ces nouveaux dendrimères (**14a**, **16a** et **17a**) de Yin *et coll.* montrent de bonnes vitesses d'internalisation dans les cellules ECV-304 (lignée cellulaire épithéliale humaine) sans être cytotoxiques pour la concentration

⁹⁴ Mecke A., Uppuluri S., Sassanella T. J., Lee D. K., Ramamoorthy A., Baker J. R., Orr B. G. and Banaszak Holl M. M. *Chem. Phys. Lipids* **2004**, 132, 3.

étudiée (1 M). Ces caractéristiques sont particulièrement intéressantes pour des applications en transfection, en délivrance de médicaments ciblée ou en imagerie.

La matrice extracellulaire désigne l'ensemble des macromolécules extracellulaires du tissu conjonctif qui entoure les cellules. Elle joue un rôle important dans le soutien structural, l'adhérence, le mouvement et la régulation des cellules. Elle est constituée en grande partie de protéines fibreuses telles que le collagène et l'élastine, de glycosaminoglycanes contenant de nombreux groupements sulfates, ainsi que de sels et d'eau. La matrice extracellulaire est ainsi hautement chargée négativement à cause de la présence des glycosaminoglycanes. Si les composants de la matrice extracellulaire sont visualisés par des moyens histochimiques ou immunofluorescents en utilisant des anticorps contre des antigènes individuels, très peu d'études concernent la visualisation directe du réseau extracellulaire en haute résolution. Müllen *et coll.* ont été les premiers à visualiser avec succès la microstructure de la matrice extracellulaire dans l'épithélium trachéal vivant⁶⁴ (cf. Figure 1-28), en utilisant une macromolécule dendritique contenant un fluorophore pérylène au cœur, appartenant à la famille des dendrimères complexes décrits plus haut (cf. Figure 1-27, dendrimère de la série **14** avec $n = 50$).

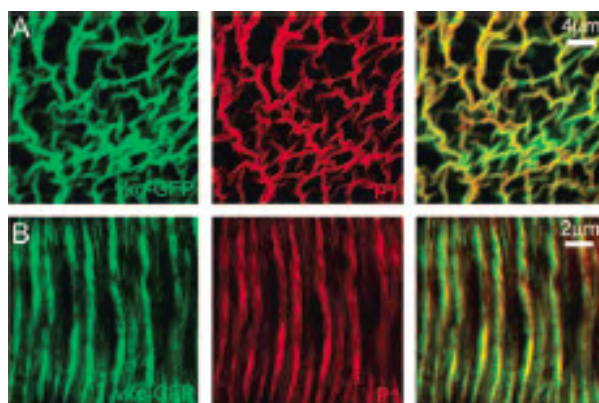


Figure 1-28 : Microscopie confocale de la matrice extracellulaire marquée par le dendrimère de Müllen *et coll.* (rouge, colonne centrale). a) dans l'épithélium de l'aile fixe ; b) dans l'épithélium trachéal⁶⁴.

Dans l'optique de développer un outil pour l'imagerie *in vivo* non invasive, Fréchet *et coll.* ont synthétisé une nano-sonde multicouche qui consiste en un cœur fluorescent dans le domaine du proche-infrarouge encapsulé dans un dendrimère biodégradable lui-même entouré

d'une enveloppe de polyéthylène oxyde⁹⁵ (cf. Figure 1-29). Le cœur fluorescent utilisé est la cypate, un chromophore polyméthine proche de l'indocyanine vert (Indocyanine green en anglais ou encore ICG) qui est un agent de contraste approuvé par la Food and Drug Administration (FDA). Ce cœur est encapsulé de manière covalente dans un dendrimère polyester biodégradable afin de pouvoir étudier les propriétés de la durée de vie de la fluorescence et de le protéger de son agrégation. Les fonctions de surface du dendrimère sont utilisées pour greffer des chaînes de polyéthylène oxyde, connues pour augmenter la biocompatibilité et le temps de séjour dans le sang.

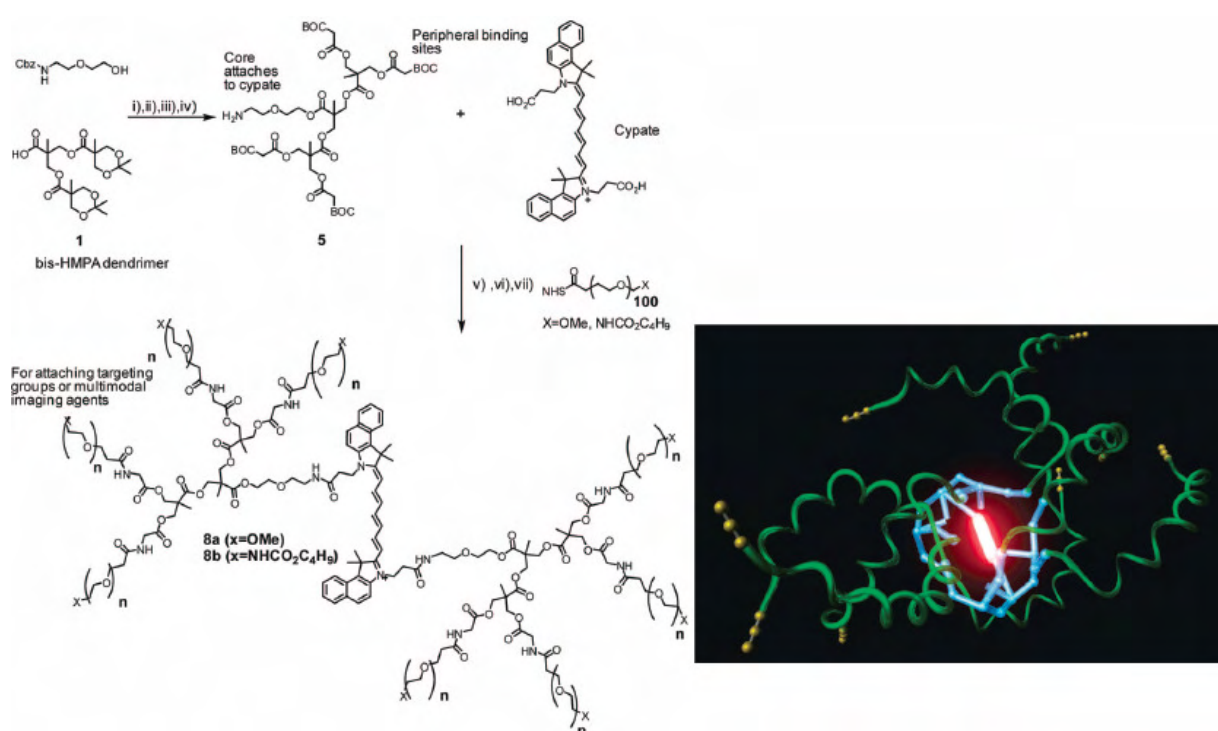


Figure 1-29 : Préparation de la nano-sonde dendritique pour l'imagerie *in vivo*⁹⁵

Le dendrimère obtenu a un temps de circulation dans le plasma de 9 heures contre moins de 5 minutes pour l'indocyanine vert seul^{96,97}. Ce temps de séjour convient à l'imagerie des systèmes cardiovasculaires et sanguins. Les auteurs ont montré lors d'une expérience sur

⁹⁵ Almutairi A., Akers W. J., Berezin M. Y., Achilefu S. and Fréchet J. M. J. *Molecular Pharmaceutics* **2008**, 5, 1103.

⁹⁶ Cuccia D. J., Bevilacqua F., Durkin A. J., Merritt S., Tromberg B. J., Gulsen G., Yu H., Wang J. and Nalcioglu O. *Appl. Opt.* **2003**, 42, 2940.

⁹⁷ Gurfinkel M., Thompson A. B., Ralston W., Troy T. L., Moore A. L., Moore T. A., Gust J. D., Tatman D., Reynolds J. S., Muggenburg B., Nikula K., Pandey R., Mayer R. H., Hawrsz D. J. and Sevcik-Muraca E. M. *Photochem. Photobiol.* **2000**, 72, 94.

souris (40 mg/kg de souris en injection, observation pendant 8 jours) que cette nano-sonde dendritique n'a pas d'effets toxiques, y compris des comportements anormaux ou des changements de poids. Par rapport au fluorophore seul, le dendrimère fluorescent s'agrège moins, sa durée de vie de fluorescence n'est pas affectée par la présence des éléments extérieurs dans son environnement et il est moins sensible à l'oxydation enzymatique et résiste à la dégradation jusqu'à ce que son enveloppe biodégradable soit entièrement métabolisée. La durée de vie de fluorescence varie en fonction de l'environnement local qui entoure le fluorophore. La mesure de la durée de vie de fluorescence (par la microscopie de fluorescence résolue en temps) a été utilisée pour fournir des informations fonctionnelles des biomolécules^{98,99}, pour étudier les structures microenvironnementales des tissus^{100,101} et dans une moindre mesure sur animaux vivants^{102,103,104}. Fréchet *et coll.* ont utilisé cette technique pour suivre la cinétique de la dégradation du dendrimère *in vivo* et ont obtenu des cartes de durée de vie de fluorescence sur l'animal entier (cf. Figure 1-30). Au début, la carte est homogène mais elle devient hétérogène au fur et à mesure, indiquant des dégradations plus ou moins importantes de l'enveloppe dendritique dans les endroits spécifiques. Plus l'enveloppe est dégradée, plus la durée de vie de fluorescence du dendrimère fluorescent est longue. La durée de vie de fluorescence la plus longue se trouve dans le foie et dans les intestins, à cause de l'augmentation de métabolisme de ce dendrimère qui s'y trouve.

⁹⁸ Berezin M. Y., Lee H., Akers W., Nikiforovich G. and Achilefu S. *Photochem. Photobiol.* **2007**, 83, 1371.

⁹⁹ Yang H., Luo G. B., Karnchanaphanurach P., Louie T. M., Rech I., Cova S., Xun L. Y. and Xie X. S. *Science* **2003**, 302, 262.

¹⁰⁰ Gadella T. W. J., Jovin T. M. and Clegg R. M. *Biophys. Chem.* **1993**, 48, 221.

¹⁰¹ Lakowicz J. R., Szmacinske H., Nowaczyk K., Berndt K. W. and Johnson M. *Anal. Biochem.* **1992**, 202, 316.

¹⁰² Bloch S., Lesage F., McIntosh L., Gandjbakhche A., Liang K. X. and Achilefu S. *J. Biomed. Opt.* **2005**, 10, 0540031.

¹⁰³ Cubeddu R., Comelli D., D'Andrea C., Taroni P. and Valentini G. *J. Phys. D : Appl. Phys.* **2002**, 35, R61.

¹⁰⁴ Reynolds J. S., Troy T. L., Mayer R. H., Thompson A. B., Waters D. J., Cornell K. K., Snyder P. W. and Seavick-Muraca E. M. *Photochem. Photobiol.* **1999**, 70, 87.

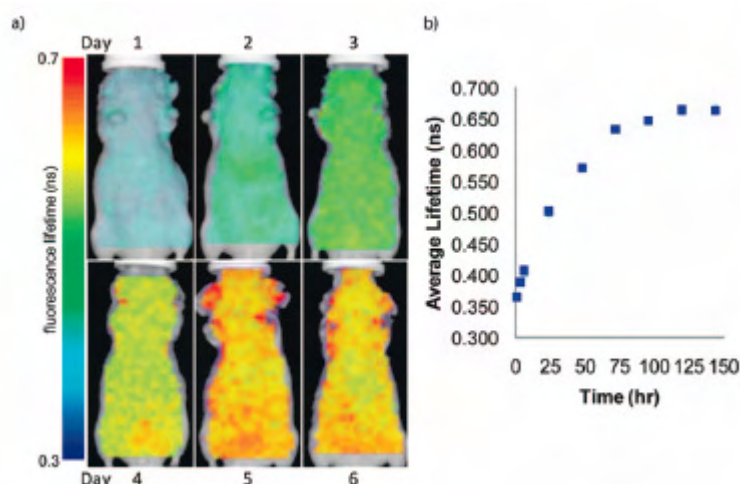


Figure 1-30 : a) Cartes de durée de vie de fluorescence de 1 à 6 jours après injection de la nano-sonde dendritique ; b) Evolution des moyennes spatiales des durées de vie de fluorescence dans le foie et dans le temps⁹⁵

1.2.3 Dendrimères acides nucléiques

Les acides nucléiques dendritiques peuvent être extrêmement utiles dans la nanomédecine, notamment pour le développement des puces à ADN dans le diagnostic en tant qu'amplificateur de signaux. De plus, grâce à la taille relativement grande des molécules acides nucléiques, les dendrimères acides nucléiques peuvent être couplés à de nombreux fluorophores et/ou des protéines avec des problèmes d'encombrement stérique ou de désactivation de fluorescence relativement limités¹⁰⁵.

Le principe des puces à ADN classiques consiste en trois étapes (cf. Figure 1-31) : i) extraction des ARNm (ARN messager) à partir de l'échantillon à analyser et de la référence ; ii) transcription réverse des ARNm en ADNc (ADN complémentaire) en incorporant des nucléotides marqués par des fluorophores (souvent des dUTP marqués par des chromophores de famille des Cyanine ou des Alexa) ; iii) hybridation des ADNc sur une même puce et comparaison des intensités de signaux fluorescents. L'analyse des intensités de fluorescence différentielles permet d'obtenir des informations sur l'expression des gènes différentielle en fonction des conditions.

¹⁰⁵ Nilsen T. W., Grayzel J. and Prenskey W. J. *Theor. Biol.* **1997**, 187, 273.

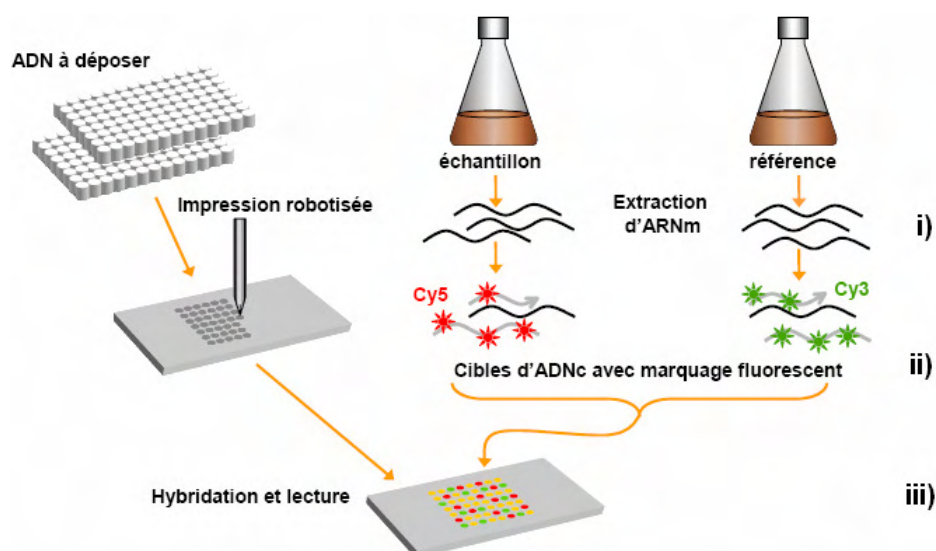


Figure 1-31 : Principe général de l'analyse de l'expression transcriptionnelle sur une puce à ADN de type "spottée"¹⁰⁶

Le problème de cette méthode d'incorporation directe de marqueurs fluorescents est que le taux d'incorporation des fluorophores dans les ADNc dépend de la composition de bases dans les ARNm et de sa longueur. Ainsi, les signaux les plus intenses peuvent ne pas correspondre aux gènes les plus exprimés, mais seulement aux gènes contenant le plus de bases marquées (souvent les uridines). Ce problème peut être résolu par l'utilisation des dendrimères acide nucléique¹⁰⁷. Stears *et coll.* ont synthétisé un dendrimère acide nucléique incorporant des nucléotides marqués avec Cy5 ou Cy3 à la surface¹⁰⁸ (cf. Figure 1-32). Ces dendrimères sont incubés avec la puce après l'hybridation des ADNc non fluorescents mais dans lesquels sont précédemment incorporés des séquences de capture différentes pour les 2 types de dendrimères. Chaque signal fluorescent correspond ainsi approximativement à un ADNc, ce qui limite le problème de dépendance à la séquence d'ARNm. De plus, chaque dendrimère possède plusieurs fluorophores (jusqu'à 250 pour certains types de dendrimère acide nucléique)¹⁰⁷, procurant ainsi une amplification des signaux.

¹⁰⁶ Lin W. Equipe Nicolas A. Institut Curie *Thèse* **2004**

¹⁰⁷ Nguyen D. V., Arpat A. B., Wang N. Y. and Carroll R. J. *Biometrics* **2002**, 58, 701.

¹⁰⁸ Stears R. L., Getts R. C. and Gullans S. R. *Physiol. Genomics* **2000**, 3, 93.

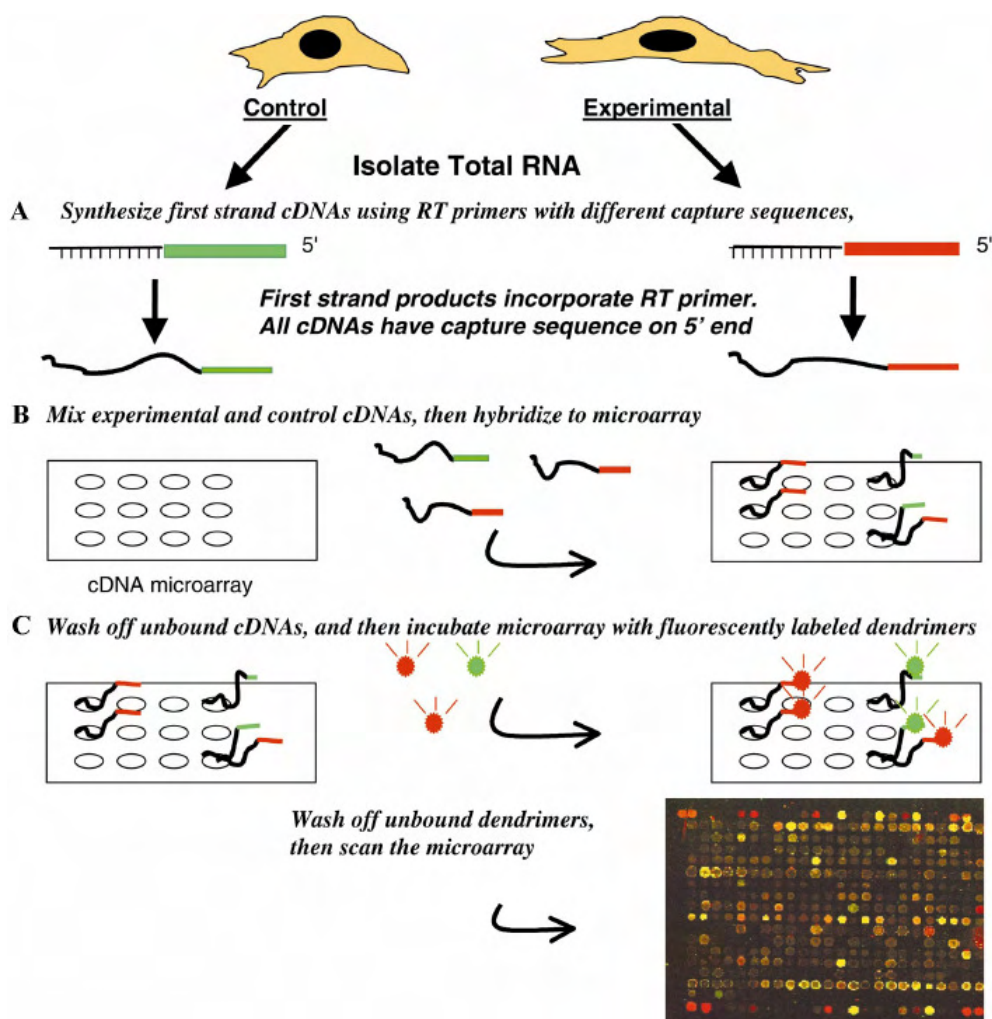


Figure 1-32 : Amplification de la détection d'ADN par dendrimère fluorescent acide nucléique¹⁰⁸

1.3 Dendrimères phosphorés fluorescents en biologie

1.3.1 Fluorophores à la surface

L'aspect multivalent des dendrimères joue un rôle très important dans la régulation immunologique des cellules avec lesquelles ils interagissent. Par exemple, des dendrimères conjugués aux glucosamines ont été utilisés pour éviter la formation de cicatrice grâce à leurs propriétés immunomodulatoire et anti-angiogène¹⁰⁹. L'utilisation de la multivalence des systèmes dendritiques a également été illustrée par des progrès récents dans le développement

¹⁰⁹ Shaunak S., Thomas S., Gianasi E., Godwin A., Jones E., Teo I., Mireskandari K., Luthert P., Duncan R., and Patterson S., *et al. Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 977.

des matériaux dendritiques antiviraux et de nouveaux ligands dendritiques pour les toxines bactériennes létales¹¹⁰.

La phagocytose, un processus du système immunitaire inné, constitue la première ligne de défense contre nombre de microorganismes et est essentielle pour le contrôle des infections bactériennes communes. Parmi les cellules phagocytaires, les monocytes sont des cellules leucocytes sanguines mononucléaires, précurseurs des macrophages¹¹¹. Ces cellules du système immunitaire inné sont cruciales dans l'initiation et la re-direction ultérieure des réponses immunitaires adaptatives. Par ailleurs, étant donné qu'il y a un délai de plusieurs jours avant la mise en place des réponses immunitaires adaptatives, l'immunité innée joue un rôle critique dans le contrôle des infections durant cette période. Les macrophages et les neutrophiles ont des récepteurs de surface capable de reconnaître et de se lier aux constituants communs de beaucoup de surfaces bactériennes¹¹². La liaison de ces bactéries aux récepteurs de surface déclenche le processus de phagocytose de ces bactéries et également induit la sécrétion des molécules biologiquement actives par ces cellules phagocytes. Poupot *et coll.* se sont intéressés spécifiquement aux interactions entre les dendrimères phosphorés et les cellules hématopoïétiques du système immunitaire humain. Pour ce faire ils ont synthétisé un dendrimère phosphoré couplé à la fluorescéine isothiocyanate afin de suivre ces interactions de manière visuelle¹¹³ (cf. Figure 1-33). L'analyse par la cytométrie de flux après l'incubation de ce dendrimère pendant 30 minutes avec les cellules PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) humaines fraîchement isolées à partir d'un donneur sain montre que seuls les monocytes sont marqués par les dendrimères. Afin de mieux caractériser l'interaction entre le dendrimère fluorescent et les monocytes humains, les auteurs ont incubé le dendrimère avec les monocytes isolés. Les images séquentielles extraites d'une vidéo filmée par la microscopie confocale montrent également que le dendrimère s'attache à la surface du monocyte en seulement quelques secondes et est progressivement internalisé (cf. Figure 1-34).

¹¹⁰ Rosa Borges A. and Schengrund C.-L. *Curr. Drug Targets Infect. Disorder* **2005**, 5, 247.

¹¹¹ Gordon S. and Taylor P. R. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, 5, 953.

¹¹² Taylor P. R., Martinez-Pomares L., Stacey M., Lin H.-H., Brawn G. D. and Gordon S. *Annu. Rev. Immunol.* **2005**, 23, 901.

¹¹³ Poupot M., Griffe L, Marchand P., Maraval A., Rolland O., Martinet L., L'Faqihi-Olive F.-E., Turrin C.-O., Caminade A.-M., Fournié J.-J., Majoral J.-P. and Poupot R. *The FASEB journal.* **2006**, 20, 2339.

La colocalisation du dendrimère phosphoré fluorescent avec le Red LysoTracker[®] (marqueur fluorescent spécifique pour les phagolysosomes dans les monocytes) met en évidence la voie d'internalisation du dendrimère par phagocytose.

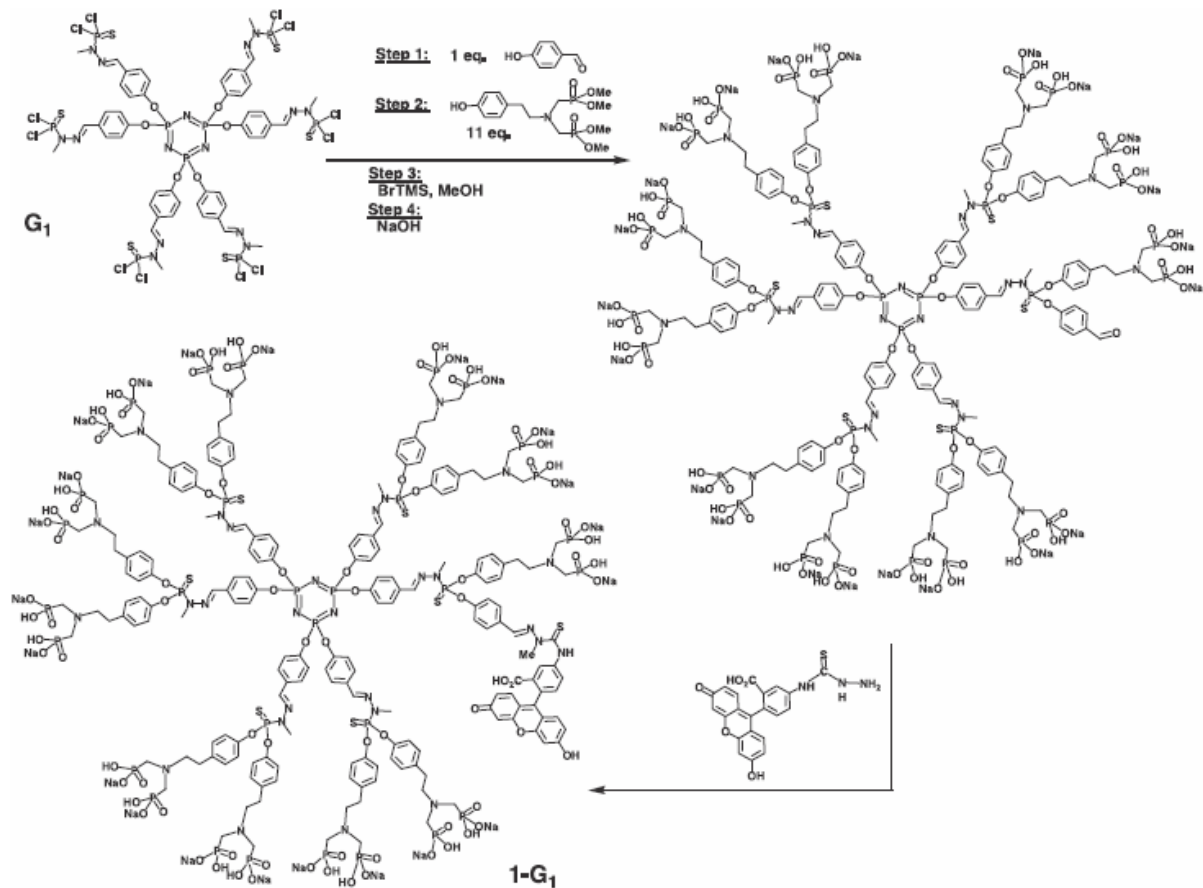


Figure 1-33 : Synthèse du dendrimère phosphoré statistiquement couplé à la FITC¹¹³

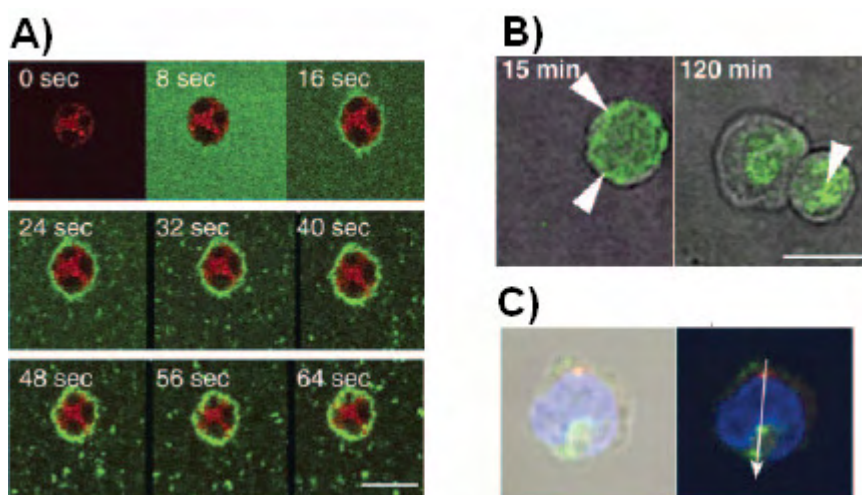


Figure 1-34 : Internalisation du dendrimère phosphoré fluorescent (vert) dans les monocytes. A) Images extraites de la vidéo filmée par la microscopie confocale ; B) Localisation intracellulaire du dendrimère ; C) Colocalisation du dendrimère avec le Red LysoTracker® (rouge) en contraste de phase (gauche) et en microscopie confocale (droite)¹¹³

Pour rechercher un récepteur potentiel du monocyte impliqué dans la reconnaissance et l'internalisation de ce dendrimère phosphoré, un dendrimère ayant un fluorophore dérivé du diphénylmaléimide directement lié au cœur a été synthétisé (cf. Figure 1-35). Ce nouveau dendrimère est conçu de sorte que ses caractéristiques fluorescentes permettent le transfert d'énergie par résonance (Frörster Resonance Energy Transfer ou encore FRET) avec la phycoérythrine (PE), un fluorophore couramment utilisé en cytométrie de flux. Le FRET est un phénomène photophysique où l'énergie est transférée de l'état excité d'un donneur fluorescent à un accepteur. La distance donneur-accepteur doit être suffisamment courte (1-20 nm)¹¹⁴ pour que ce transfert ait lieu. Les auteurs ont mélangé le dendrimère phosphoré diphénylmaléimide avec une banque d'anticorps-PE contre les différents récepteurs du monocyte, l'émission de fluorescence de la phycoérythrine ne peut avoir lieu par le FRET que si le dendrimère est suffisamment proche. Parmi tous les anticorps testés, seuls ceux contre le récepteur TLR2 ont pu être excités et émettent la fluorescence par le FRET *via* le dendrimère, ce qui indique que ce récepteur TLR2 est impliqué dans la reconnaissance du dendrimère phosphoré azabisphosphonique par les monocytes.

¹¹⁴ Jares-Erijman E. A. and Jovin T. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 409.

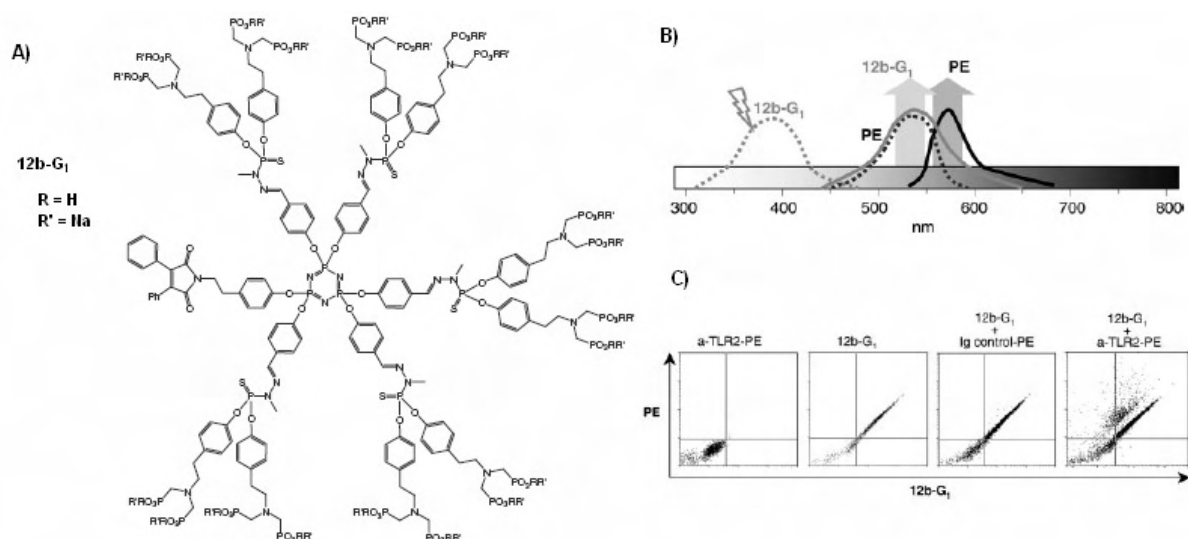


Figure 1-35 : A) Dendrimère phosphoré azabisphosphonique contenant un dérivé du diphenylmaléimide lié au cœur ; B) Les caractéristiques de fluorescence du dendrimère et de la PE permettant le FRET ; C) Le TLR2 impliqué dans la reconnaissance du dendrimère (Ig control-PE : immunoglobuline de souris)¹¹³

1.3.2 Dendrimère "Janus"

Une méthode pour combiner la fluorescence et la solubilité dans l'eau d'un outil dendritique de manière contrôlée est de construire un dendrimère "surface-block" en "Janus" possédant sur une face des groupements hydrophiles et sur l'autre des groupements fluorescents¹¹⁵ (cf. Figure 1-36). Fuchs *et coll.* ont rapporté deux façons de synthétiser des dendrimères phosphorés en "Janus" possédant à la fois des groupements dansyl fluorescents et des groupements cationiques à la surface. Le point clé de la synthèse d'un tel dendrimère est le couplage des deux différents dendrons au niveau de leur cœur, ce couplage peut être réalisé soit par un couplage peptidique, soit par une condensation classique entre une hydrazine et un aldéhyde (cf. Figure 1-36). Les dendrimères obtenus possèdent des caractéristiques de fluorescence intéressantes, et sont potentiellement exploitables pour des applications biologiques.

¹¹⁵ Fuchs S., Pla-Quintana A., Mazères S., Caminade A.-M. and Majoral J.-P. *Org. Letters* **2008**, 10, 4751.

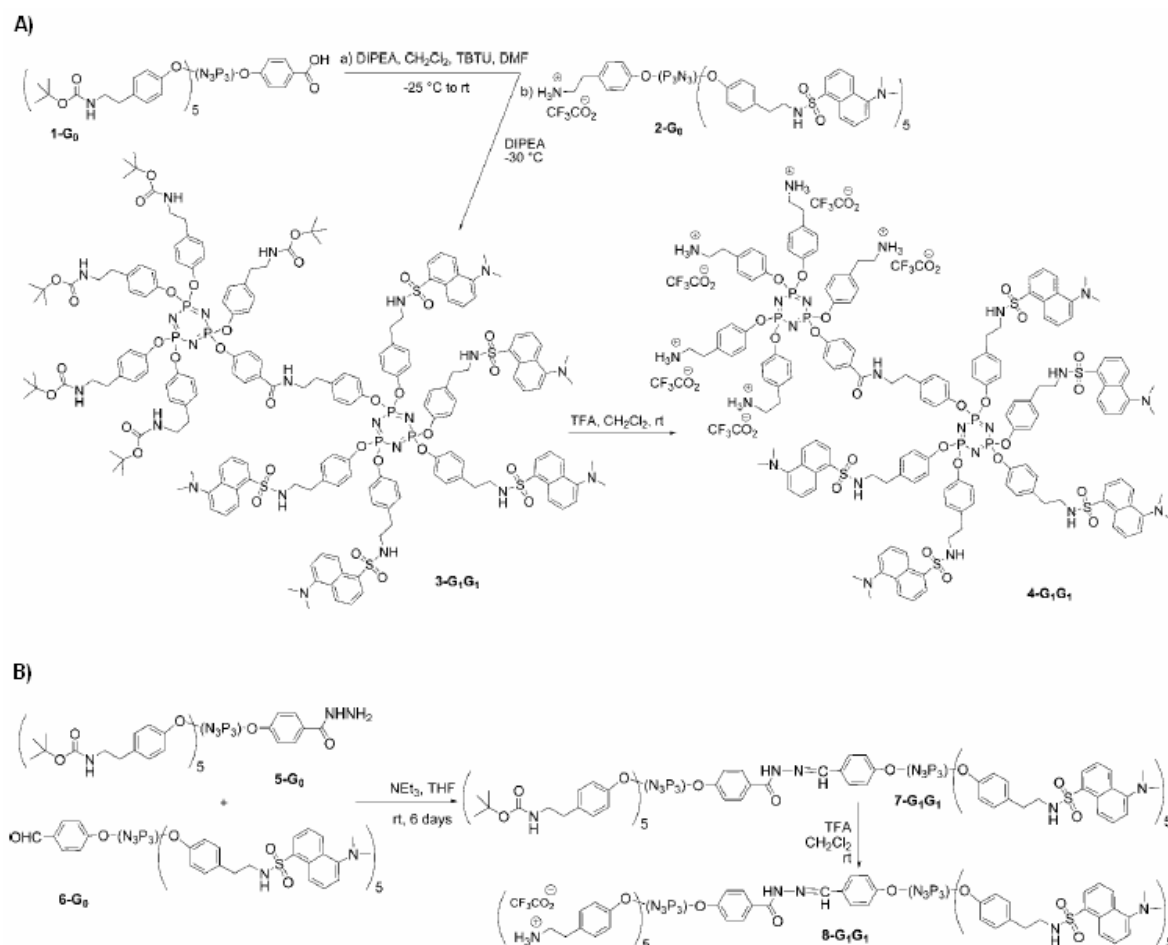


Figure 1-36 : Les deux voies de synthèse du dendrimère Janus. A) par couplage peptidique ; B) par condensation entre l'hydrazone et l'aldéhyde¹¹⁵

La synthèse de ces nouveaux dendrimères Janus offre la possibilité de combiner plusieurs types d'entités, chimiques ou biologiques, à la surface des dendrimères de manière parfaitement contrôlée, par opposition aux dendrimères PAMAM sur lesquels les différentes entités sont greffées de manière statistique.

1.3.3 Nanodots organiques brillants

Les nouvelles microscopies basées sur les phénomènes optiques non linéaires (NonLinear Optics ou NLO) tels que la fluorescence induite par une absorption biphotonique

(Two-Photon Excited Fluorescence ou TPEF)¹¹⁶ sont rapidement devenues populaires dans le domaine de l'imagerie biologique grâce à de nombreux avantages que ces techniques peuvent offrir, à savoir une excitation spatialement confinée, une résolution tridimensionnelle intrinsèque, une meilleure pénétration dans le tissu biologique en imagerie, une réduction d'effet destructif lié à l'excitation et une diminution de bruits de fond liés aux phénomènes d'autofluorescence du tissu en utilisant des longueurs d'onde d'excitation dans la zone proche-infrarouge. L'ingénierie moléculaire des chromophores optimisés avec de grandes sections efficaces est particulièrement active depuis ces dernières années^{117,118,119} et a conduit à des applications telles que l'imagerie des membranes biologiques et des cellules. Néanmoins, des fluorophores à absorption biphotonique (Two-Photon Absorption en anglais ou TPA) solubles dans l'eau et qui maintiennent à la fois un bon rendement quantique et une grande section efficace dans la zone spectrale d'intérêt sont encore rares. De plus, des fluorophores TPA ayant une grande section efficace dans les solvants organiques tels que le toluène voient souvent les caractéristiques se dégrader dans l'eau à cause des agrégations moléculaires¹²⁰. Pour contourner ce problème, Krishna *et coll.* ont synthétisé un dendrimère phosphoré ayant un fluorophore TPA au cœur et des groupements cationiques à la surface^{121,122}. Ainsi le nouveau dendrimère, appelé "nanodot organique", est fluorescent et

¹¹⁶ Denk W., Strickler J. H. and Webb W. W. *Science* **1990**, 248, 73.

¹¹⁷ a) Chung S.-J., Kim K.-S., Lin T.-C., He S., Swiatkiewicz J. and Prasad P. N. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 10741 ; b) Ventelon L., Moreaux L., Mertz J. and Blanchard-Desce M. *Chem. Commun.* **1999**, 2055 ; c) Rumi M., Ehrlich J. E., Heikal A. A., Perry J. W., Barlow S., Hu Z.-Y., McCord-Maughon D., Parker T. C., RKckel H., Thayumanavan S., Marder S. R., Beljonne D. and BrLdas J.-L. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 9500 ; d) Cho B. R. Son K. H., Lee S. H., Song Y.-S., Lee Y.-K., Jeon S.-J., Choi J. H., Lee H. and Cho M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10039 ; e) Mongin O., PorrmS L., Moreaux L., Mertz J. and Blanchard-Desce M. *Org. Lett.* **2002**, 4, 719 ; f) Yang W. J., Kim D. Y., Kim C. H., Jeong M.-Y., Lee S. K., Jeon S.-J. and Cho B. R. *Org. Lett.* **2004**, 6, 1389 ; g) Porres L., Mongin O., Katan C., Charlot M., Pons T., Mertz J. and Blanchard-Desce M. *Org. Lett.* **2004**, 6, 47 ; h) Le Droumaguet C., Mongin O., Werts M. H. V. and Blanchard-Desce M. *Chem. Commun.* **2005**, 2802.

¹¹⁸ Ventelon L., Charier S., Moreaux L., Mertz J. and Blanchard-Desce M. *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2156 ; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2098.

¹¹⁹ Werts M. H. V., Gmouh S., Mongin O., Pons T. and Blanchard-Desce M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16294.

¹²⁰ Woo H. Y., Hong J.W., Liu B., Mikhailovsky A., Korystov D., Bazan G. C., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 820.

¹²¹ Leclaire J., Coppel Y., Caminade A.-M. and Majoral J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2304.

soluble dans l'eau (cf. Figure 1-37). L'étude de la photoluminescence (un photon) a montré que cette approche dendritique est efficace pour apporter la solubilité dans l'eau tout en gardant l'efficacité de la fluorescence. Contrairement au fluorophore seul, neutre ou cationique, les dendrimères fluorescents, quelle que soit la génération, possèdent de grandes sections efficaces dans l'eau, ce qui confirme la capacité des branches dendritiques à isoler le cœur fluorescent. De plus, les caractéristiques TPA de ces dendrimères s'améliorent légèrement avec le nombre de générations. Des calculs et des expériences récents ont montré que l'augmentation de la polarité des solvants permet d'améliorer l'efficacité de l'absorption biphotonique¹²³. Leclaire *et coll.* avaient précédemment montré que les branches dendritiques fournissent un environnement polaire¹²⁴. Le cœur fluorescent qui voit la polarité locale augmenter avec la croissance dendritique devient donc plus performant.

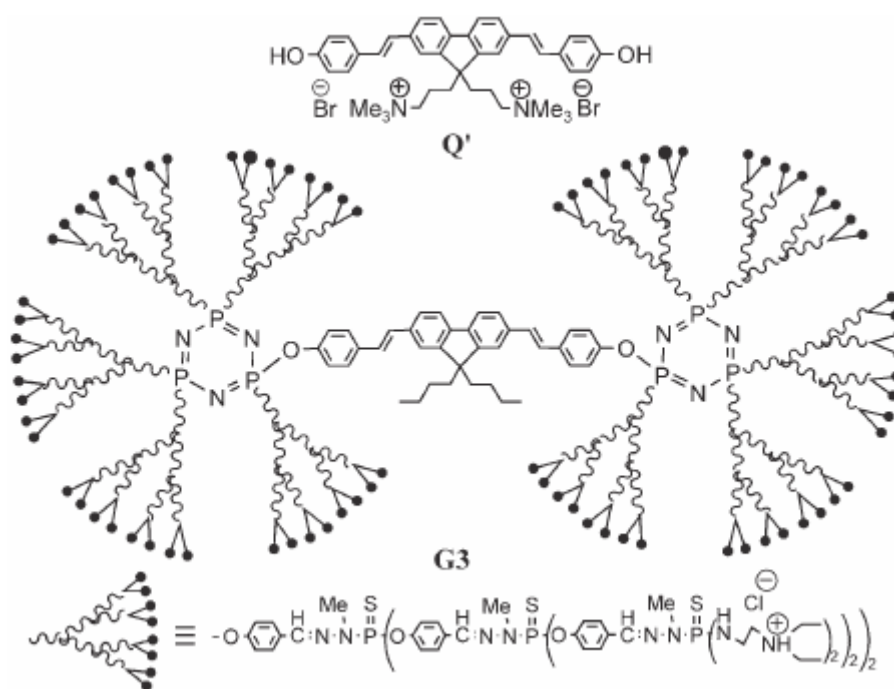


Figure 1-37 : Dendrimère fluorescent à absorption biphotonique soluble dans l'eau¹²²

¹²² Krishna T. R., Parent M., Werts M. H. V., Moreaux L., Gmouh S., Charpak S., Caminade A.-M., Majoral J.-P. and Blanchard-Desce M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4645.

¹²³ Masunov A., Tretiak S., Hong J. W. and Bazan G. C. *Abstracts of Papers, 229th ACS National Meeting, San Diego, CA, March 13 – 17, 2005*, COMP-295.

¹²⁴ Leclaire J., Dagiral R., Fery-Forgues S., Coppel Y., Donnadieu B., Caminade A.-M. and Majoral J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15762.

L'imagerie *in vivo* du réseau vasculaire dans la partie dorsale du bulbe olfactif du rat a été réalisée après l'injection intraveineuse d'une solution aqueuse (500 μ M) de ce dendrimère fluorescent TPA de 2^{ème} génération (cf. Figure 1-38). La fluorescence a été obtenue avec une excitation à 710 nm, et l'image a été prise à une profondeur d'environ 200 μ m. Aucun effet toxique a été observé durant l'expérience¹²². Ceci démontre que les nanodots organiques constituent une très bonne alternative aux quantum dots inorganiques, qui sont des agents d'imagerie photonique actuellement très populaires¹²⁵, mais qui présentent des effets toxiques très discutables¹²⁶.

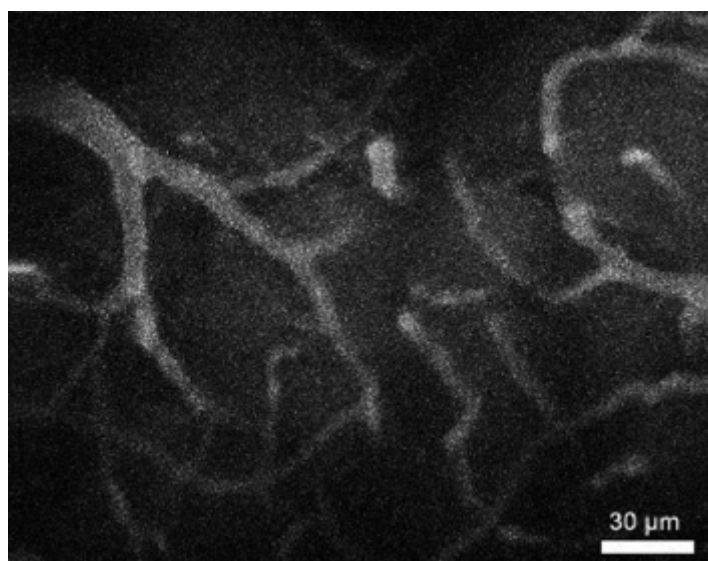


Figure 1-38 : Imagerie du réseau vasculaire de la partie dorsale du bulbe olfactif du rat¹²²

1.4 Conclusion

Les dendrimères sont des macromolécules multifonctionnelles qui permettent de combiner les caractères individuels des différentes molécules en une seule et unique entité. Cet aspect plateforme a été particulièrement exploité dans le cas des dendrimères PAMAM. Les dendrimères PAMAM fluorescents sont obtenus en couplant de manière statistique certaines des extrémités amines aux molécules fluorescentes telles que la fluorescéine, la rhodamine, les cyanines ou encore les alexa. Ces dendrimères fluorescents ont grandement

¹²⁵ Larson D. R., Zipf W. R., Williams R. M., Clark S. W., Bruchez M. P., Wise F. W. and Webb W. W. *Science* **2003**, 300, 1434.

¹²⁶ Hardman R. *Environmental Health Perspectives* **2006**, 114, 165.

contribué aux études des interactions dendrimères – cellules en fonction de la nature de la surface dendritique, et à la compréhension du mécanisme d'internalisation des dendrimères polycationiques dans les cellules. Lorsqu'une partie de la surface des dendrimères PAMAM fluorescents est couplée à des motifs de ciblage capables de reconnaître ou d'être reconnus dans le système biologique, ils permettent d'effectuer l'imagerie des cellules ciblées *in vitro* ou des tissus ciblés *ex vivo*¹²⁷. Des agents thérapeutiques peuvent également être conjugués à la surface des dendrimères PAMAM en plus des fluorophores et des agents de ciblage. La visualisation directe des dendrimères PAMAM par la fluorescence permet de suivre le devenir de ces derniers et d'assurer ainsi la bonne localisation des agents thérapeutiques. Néanmoins, si ces dendrimères PAMAM fluorescents permettent d'accomplir des études *in vitro* relativement complètes et approfondies, l'imagerie *in vivo* non invasive par ce type de sonde fluorescente est encore rare. De plus, les structures de ces sondes à base des dendrimères PAMAM sont en quelque sorte inconnues puisque les greffages des différents agents sur les dendrimères PAMAM s'effectuent de manière statistique.

Un dendrimère n'est pas seulement sa surface multifonctionnelle, nous avons déjà vu dans ce chapitre qu'il existe d'autres types de dendrimères fluorescents ayant un fluorophore au cœur pour des applications diverses et variées allant du biocapteur à l'imagerie *in vivo*. Par rapport aux fluorophores seuls, ces dendrimères fluorescents présente un caractère souvent plus résistant grâce à des couches protectrices qui entourent le fluorophore au cœur. De plus, la surface de ces dendrimères est libre d'être modifiée afin de conférer à ces sondes fluorescentes une bonne solubilité dans l'eau ou une spécificité pour certaines catégories de cellules. Malgré ces gains en stabilité et en solubilité, l'imagerie fluorescente *in vivo* non invasive des événements cellulaires ciblés en profondeur par ce type de sondes reste très difficile. En effet, en termes d'intensité de fluorescence, le couplage d'un agent de ciblage au dendrimère possédant un seul fluorophore ne représente pas de gain réel par rapport au même agent de ciblage couplé directement au fluorophore, puisque le nombre de fluorophores par agent de ciblage reste inchangé.

¹²⁷ Sarin H., Kanevsky A. S., Wu H., Brimacombe K. R., Fung S. H., Sousa A. A., Auh S., Wilson C. M., Sharma K., Aronova M. A., Leapman R. D., Griffiths G. L. and D Hall M. J. *Translational Med.* **2008**, 6, 80.

Les dendrimères phosphorés s'avèrent particulièrement modulables et ils permettent d'incorporer à la fois différents motifs à différents endroits de la structure, à la surface, dans les branches, et au cœur. Dans cette thèse, nous avons pour objectif de concevoir de nouveaux dendrimères fluorescents pour imager des événements cellulaires et moléculaires durant des processus biologiques spécifiques et en particulier le développement d'un cancer chez l'animal vivant et entier. Trois aspects sont à étudier pour la construction d'un tel dendrimère : i) la fluorescence apportée par des fluorophores incorporés dans la structure dendritique de manière contrôlée ; ii) la spécificité apportée par un motif de reconnaissance couplé au dendrimère ; iii) la solubilité dans l'eau du dendrimère apportée par des motifs hydrophiles. Afin d'éviter les problèmes d'autofluorescence, d'avoir une meilleure pénétration du rayon laser dans le tissu biologique et de limiter les dégâts dus aux irradiations, nous avons synthétisé un fluorophore proche-infrarouge "maison" dérivé de pérylène diimide. Nous avons conçu une structure dendritique capable de greffer nos dix fluorophores "maison" à la surface tout en gardant la monodispersité et d'accrocher un anticorps pour la reconnaissance biologique. Cette partie de travail sera détaillée dans le chapitre II.

Les dendrimères polycationiques sont des agents très prometteurs pour la transfection, mais le mécanisme biologique durant le processus de transfert d'ADN n'est pas entièrement connu. Nous avons donc développé un dendrimère polycationique possédant un dérivé maléimide fluorescent directement lié au cœur et étudié ses propriétés physicochimiques et ses capacités à interagir avec un ADN plasmidique.

La solubilité dans les solvants aqueux du dendrimère est essentielle pour son application en biologie. Au cours de cette thèse, nous avons mise au point la synthèse d'un dendrimère possédant des chaînes de polyéthylène glycol à la surface. Le polyéthylène glycol est connu pour permettre le camouflage des nano-objets aux yeux du système immunitaire et d'augmenter le temps de séjour de ces nano-objets dans le sang. Cette partie très importante pour l'utilisation des dendrimères phosphorés dans le système biologique sera décrite dans le chapitre IV.

Dans l'optique d'augmenter l'efficacité fluorescente afin de réaliser l'imagerie *in vivo* non invasive, nous nous sommes intéressés à la famille des fluorophores à absorption biphotonique. Dans le cadre du projet "nanodots organiques" en collaboration avec le Laboratoire Synthèse et Electrosynthèse Organiques de l'Institut de Chimie à l'Université de Rennes I, nous avons construit des dendrimères phosphorés incorporant des fluorophores TPA dans les branches et/ou en surface possédant parfois plusieurs couches de fluorophores différents. Le fait d'incorporer des fluorophores dans les branches dendritiques permet d'avoir une surface dendritique libre de modification. Nous avons ainsi synthétisé un dendrimère hydrosoluble possédant des fluorophores à absorption biphotonique dans les branches et des chaînes de polyéthylène glycol à la surface. La synthèse de ces "nanodots organiques" ainsi que les études préliminaires de leurs propriétés photoluminescentes seront détaillées dans le chapitre V.

Chapitre

2

**Vers un nouveau dendrimère
fluorescent dans le Proche-InfraRouge**

Table des matières

2.1	Introduction	66
2.2	Synthèse générale du dendrimère phosphoré	67
2.3	Dendrimère à cœur phthalocyanine	69
2.4	Dendrimère rhodamine	72
2.4.1	Monomère rhodamine-tyramine et sa cyclisation	73
2.4.2	Dendrimère-RodamineB	76
2.5	Dendrimère pérylène	79
2.5.1	Choix du fluorophore.....	79
2.5.2	Synthèse du dendrimère pérylène	81
2.5.2.1	Rétrosynthèse du monomère dérivé de pérylène.....	81
2.5.2.2	Synthèse du monomère dérivé de pérylène.....	83
2.5.2.3	Greffage du monomère dérivé du pérylène sur le dendrimère	90
2.5.3	Synthèse du dendri- pérylène incorporant un bras espaceur	91
2.5.3.1	Synthèse du bras-espaceur.....	92
2.5.3.2	Synthèse d'un nouveau dendrimère-pérylène incorporant le bras-espaceur	94
2.5.4	Propriétés fluorescentes.....	99
2.5.5	Couplage du dendri-pérylène incorporant un bras à une protéine.....	104
2.6	Conclusion	106
2.7	Partie expérimentale	107

2.1 Introduction

Récemment, différentes familles de dendrimères fluorescents ont été développées en vue de diverses applications notamment en biologie et en médecine (cf. Chapitre I). Le défi actuel porte sur la capacité à localiser avec précision les cellules cancéreuses et à imager en profondeur des événements moléculaires et cellulaires lors du développement d'un cancer chez l'animal vivant et entier grâce à une sonde fluorescente. Bien que l'imagerie par fluorescence des animaux vivants et entiers ait connu de grands progrès depuis la dernière décennie^{1,2,3}, ses performances restent cependant limitées. Il y a de nombreuses améliorations à apporter notamment au niveau des sondes fluorescentes utilisées, à savoir la biocompatibilité, la spécificité et l'intensité.

Nous avons déjà vu dans le chapitre I que le dendrimère phosphoré est particulièrement modulable à tous les points de sa structure de manière contrôlée et qu'il a fait preuve de biocompatibilité dans plusieurs études récentes^{4,5}. Grâce à ces nombreux avantages, nous pouvons concevoir différentes catégories de sondes fluorescentes à base de dendrimère phosphoré en fonction des besoins.

L'architecture du nouveau dendrimère fluorescent dépend fortement de la structure du fluorophore sélectionné. Etant donné que certaines substances telles que le collagène, l'élastine ou encore le tryptophane contenues dans les tissus biologiques peuvent provoquer de l'autofluorescence lorsque ces derniers sont illuminés par la lumière UV ou visible, ce qui pose souvent des problèmes d'interférence dans la détection par la microscopie à fluorescence⁶, il est préférable d'utiliser une lumière de longueur d'onde élevée, idéalement dans la zone proche-infrarouge. Ceci permettrait également de limiter le photo-dommage

¹ Ntziachristos V., Ripoll J., Wang L. V. and Weissleder R. *Nature Biotechnology* **2005**, 23, 313-320

² Petrovsky A., Schellenberger E., Josephson L., Weissleder R. and Bogdanov A. *Cancer Research* **2003**, 63, 1936-1942

³ Hoffman R. M. *Trends in Mol. Med.* **2002**, 8, 354-355

⁴ Caminade A.-M. and Majoral J.-P. *Progress in polymer science* **2005**, 30, 491-505

⁵ Poupot M., Griffe L., Marchand P., Maraval A., Rolland O., Martinet L., L'Faqihi-Olive F.-E., Turrin C.-O., Caminade A.-M., Fournié J.-J., Majoral J.-P. and Poupot R. *The FASEB Journal*. **2006**, 20, 2339-2351

⁶ Monici M. *Biotechnol. Annu. Rev.* **2005**, 11, 227-56

durant l'excitation puisque l'énergie de la radiation est plus basse pour les lumières de grande longueur d'onde. Un autre moyen efficace permettant d'éviter ces problèmes d'autofluorescence est l'utilisation de la microscopie à fluorescence multiphotonique et en particulier biphotonique. L'incorporation de certains fluorophores à absorption biphotonique dans la structure du dendrimère phosphoré pour former des nanodots organiques très brillants a déjà été étudiée et sera détaillée dans le chapitre V.

Le choix du fluorophore qui émet dans la zone proche-infrarouge et qui possède une structure compatible avec la synthèse du dendrimère phosphoré est en réalité assez limité. Après une étude bibliographique, trois fluorophores couramment utilisés ont été retenus. Dans ce présent chapitre, trois types de dendrimère que nous avons conçus et synthétisés, contenant respectivement la phthalocyanine, la rhodamine et un dérivé du pérylène diimide seront décrits et discutés. Pour le dendrimère pérylène, son couplage à une protéine (un anticorps ou l'albumine de sérum bovin) a également été envisagé.

2.2 Synthèse générale du dendrimère phosphoré

Avant de décrire les différentes synthèses des dendrimères phosphorés fluorescents, il est nécessaire de rappeler la synthèse générale et la caractérisation des dendrimères phosphorés. La méthode de synthèse dendritique habituellement utilisée est une méthode divergente qui consiste en l'itération de deux étapes clé à partir du cœur. La RMN ^{31}P joue un rôle majeur dans le contrôle de chacune des étapes de croissance. Par exemple, à partir du cœur hexachlorocyclotriphosphazène, la première étape consiste en la substitution nucléophile des atomes de chlore par le 4-hydroxybenzaldéhyde activé *in situ* par le carbonate de césium (ou de potassium) (cf. Figure 2-1). La réaction est contrôlée en RMN ^{31}P par l'apparition d'un singulet à 7,5 ppm correspondant au produit hexa-substitué et par la disparition du signal correspondant à l'hexachlorotriphosphazène (20 ppm) ainsi que d'autres signaux correspondant aux produits di-, tri-, tétra- et penta-substitués. Ce dendrimère de génération 0 à extrémité aldéhyde est isolé par filtration des sels formés et par précipitation dans le méthanol.

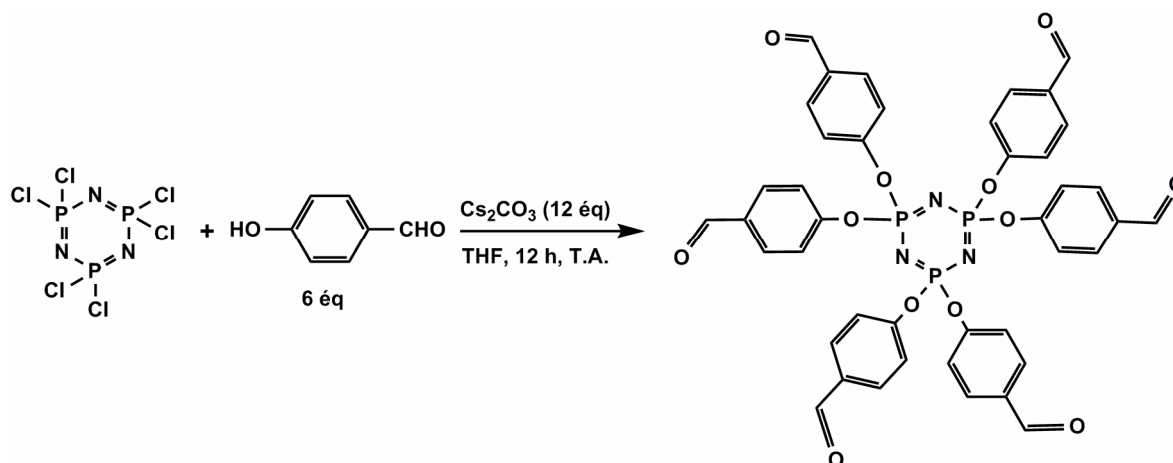


Figure 2-1 : Synthèse du dendrimère phosphoré de génération 0 à extrémité aldéhyde

La seconde étape consiste en la condensation entre les extrémités aldéhydes et le phosphorhydrazide, synthétisé à partir de la méthylhydrazine et du trichlorure de thiophosphoryle (cf. Figure 2-2). La synthèse de ce phosphorhydrazide est probablement le point le plus difficile dans la synthèse du dendrimère phosphoré, car la substitution nucléophile d'un seul chlore du trichlorure de thiophosphoryle nécessite des conditions expérimentales extrêmement strictes. Une solution de méthylhydrazine dans le chloroforme doit être additionnée goutte à goutte à une solution de trichlorure de thiophosphoryle à basse température (-62°C). La réaction est contrôlée par la RMN ^{31}P (C_6D_6) où le phosphorhydrazide est caractérisé par un signal singulet à 73 ppm. Le sel de méthylhydrazine formé est éliminé par filtration. Le phosphorhydrazide est gardé en solution dans le chloroforme à -30°C .

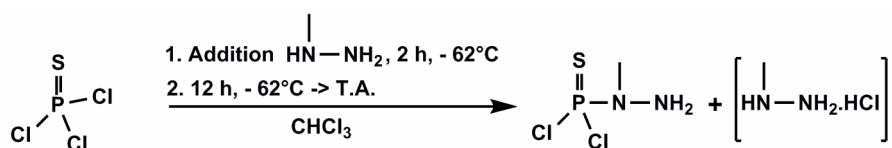


Figure 2-2 : Synthèse du N-méthyldichlorothiophosphorhydrazide

La condensation du phosphorhydrazide sur les extrémités aldéhyde du dendrimère dans le chloroforme (cf. Figure 2-3) permet d'obtenir le dendrimère de 1^{ère} génération à extrémité chlore qui est caractérisé en RMN ^{31}P par un signal à 8,2 ppm correspondant au cœur triphosphazène et par un nouveau signal vers 62,5 ppm correspondant aux atomes de phosphore en périphérie. La réaction complète est indiquée en RMN ^1H par la disparition du

signal vers 10 ppm correspondant aux protons des extrémités aldéhyde. L'excès de phosphorhydrazide est éliminé par la technique de lavage/précipitation. En répétant ces deux étapes, cette famille de dendrimère phosphoré a été obtenue jusqu'à la 8^{ème} génération⁷.

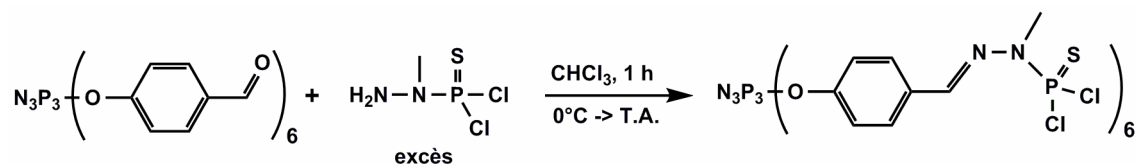


Figure 2-3 : Synthèse du dendrimère phosphoré de 1^{ère} génération à extrémité chlore

2.3 Dendrimère à cœur phthalocyanine

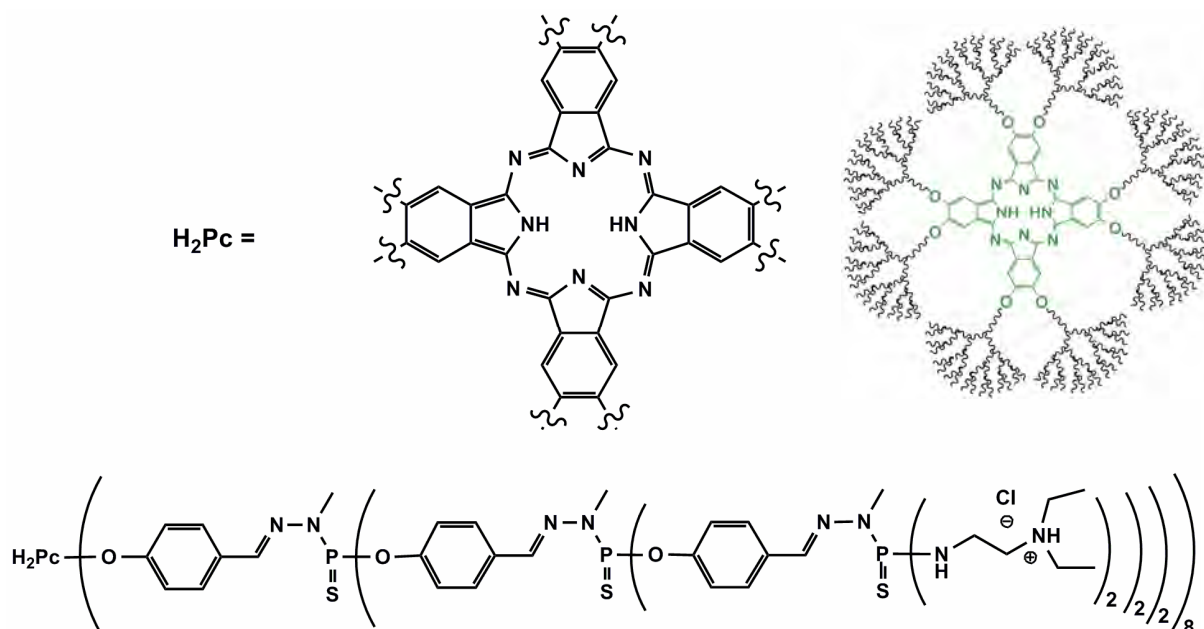


Figure 2-4 : Dendrimère polycationique de 3^{ème} génération à cœur phthalocyanine

Dans un premier temps, une famille de dendrimères phosphorés de 1^{ère} à 4^{ème} génération à cœur phthalocyanine et aux extrémités dichlorothiophosphines a été synthétisée. Cette famille de dendrimères a été conçue et synthétisée au départ dans le but d'étudier les propriétés de la structure interne du dendrimère grâce à la sonde intégrée, le cœur phthalocyanine⁸. Ces dendrimères ont permis de mieux analyser les comportements de la

⁷ Majoral J.-P. and Caminade A.-M. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 845.

⁸ Leclaire J., Dagiral R., Fery-Forgues S., Coppel Y., Donnadieu B., Caminade A.-M., Majoral J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15762-15770

structure interne du dendrimère face à des changements environnementaux et de comprendre les influences de chaque partie du dendrimère phosphoré, à savoir le cœur, les branches et la surface, sur l'ensemble structural.

Le simple fait de substituer les atomes de chlore par la diéthyléthylènediamine permet de former des ammoniums à la surface de ces dendrimères et de les rendre ainsi solubles dans l'eau (cf. Figure 2-4). Des tests biologiques sur un tel dendrimère de 3^{ème} ont été réalisés au sein du laboratoire de biophysique cellulaire à l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS).

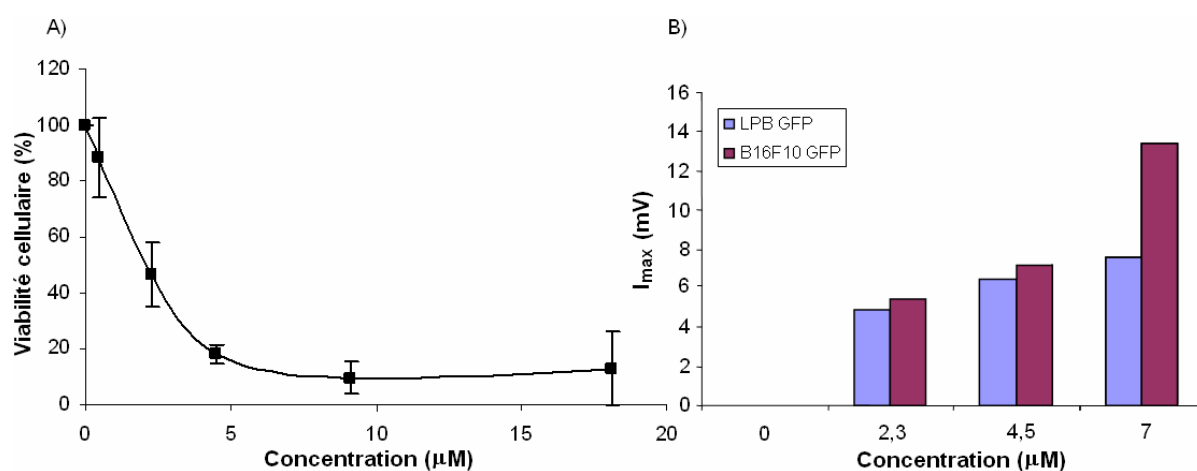


Figure 2-5 : Tests biologiques sur le dendrimère phthalocyanine de 3^{ème} génération : A) Test de MTT sur les cellules B16F10 ; B) Production de ROS par les cellules LPB et B16F10 marquées à la GFP (Green Fluorescent Protein)

La cytotoxicité du dendrimère phthalocyanine a été étudiée par le test MTT qui consiste à mesurer l'activité métabolique des cellules. Le principe du test MTT est basé sur la réduction du réactif, le MTT (bromure de 3-[4-5-méthylthiaz-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium) qui colore le milieu de culture en jaune, par les réductases en activité contenues dans les cellules vivantes en un composé insoluble dans les milieux aqueux, le formazan. Le formazan est ensuite solubilisé par ajout d'un solvant organique et la couleur du milieu de culture devient pourpre. C'est cette transformation de couleur (jaune → pourpre) mesurée par la spectrophotométrie qui permet de remonter à l'activité métabolique et donc de quantifier les cellules vivantes.

Le résultat du test MTT *in vitro* sur une lignée de cellules cancéreuses B16F10 (cellules du mélanome) en toxicologie montre une cytotoxicité assez prononcée ($CI_{50} = 2,3$ M) (cf. Figure 2-5). Il a également été observé que le dendrimère phthalocyanine s'accumule rapidement (moins de 15 minutes après l'incubation avec les cellules) à la membrane des cellules NIH 3T3 (lignée cellulaire du fibroblaste), à cause de la surface polycationique (cf. Figure 2-6). Ceci expliquerait en partie la toxicité de ce dendrimère *in vitro*. En effet, il a été montré auparavant que les multiples charges positives favorisent l'interaction entre le dendrimère et la membrane cellulaire et peut causer la mort des cellules en déstabilisant la membrane⁹ (cf. Chapitre I). Par ailleurs, une production importante d'espèces réactives oxygénées (ROS en anglais : *Reactive Oxygen Species*) *in vitro* par des cellules LPB (cellules de fibrosarcome de souris) et B16F10 (Cellules du mélanome) au contact des dendrimères phthalocyanines a été détectée, ce qui explique en grande partie la cytotoxicité de ce dendrimère (cf. Figure 2-5). En effet, il est connu que les phthalocyanines sont capables de générer des espèces réactives oxygénées et cette propriété est à la base de certaines thérapies photodynamiques pour détruire les cellules cancéreuses^{10,11,12,13}.

⁹ Wiwattanapatapee N. M. R., Klopsch R., Lorenz H., Weener J. W., Meijer E. W, Paulus W. and Duncan R. *J. Controlled Release* **2000**, 65, 133.

¹⁰ Allen C. M., Sharman W. M. and Van Lier J. E. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2001**, 5, 161.89, 102, 113

¹¹ Sobolev A. S. and Stranadko E. F. *Int. Photodynamics* **1997**, 1, 2.

¹² Oschner M. *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* **1996**, 32, 3.

¹³ Lukyanets E. A. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **1999**, 3, 424.

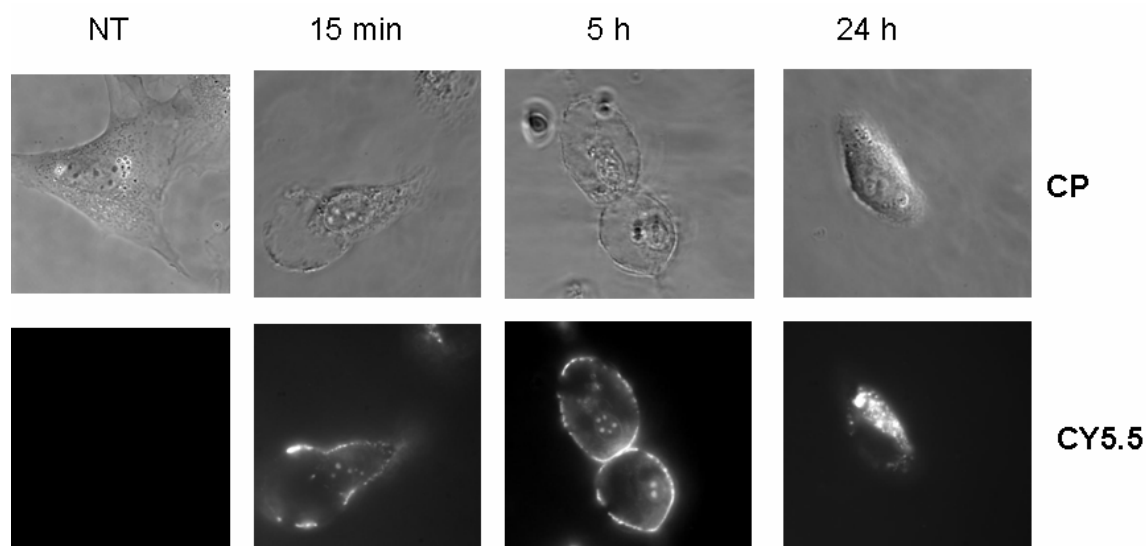


Figure 2-6 : Accumulation des dendrimères phthalocyanine (6 M) à la membrane cellulaire de la lignée NIH 3T3. En haut : images obtenues en contraste de phase ; en bas : images obtenues avec le filtre CY5.5. NT : Non traitée.

Afin de vérifier si ce dendrimère phthalocyanine permet de réaliser l'imagerie *in vivo* sur l'animal entier, une solution de dendrimère phthalocyanine (90 M , 100 L) a été injectée à une souris "nude" (souris dépourvue de système immunitaire) en intraveineux, aucune fluorescence n'a été détectée en imagerie à fluorescence non invasive.

2.4 Dendrimère rhodamine

En dehors du problème de production importante des dérivés réactifs de l'oxygène lors du contact de ce dendrimère à cœur phthalocyanine avec les cellules *in vitro* et de la cytotoxicité des polycations de la surface, le fait d'avoir un chromophore au cœur ne permet pas de fournir une intensité de fluorescence suffisante pour l'imagerie non invasive des animaux vivants en entier. Il est alors impératif d'envisager de greffer des chromophores à la surface du dendrimère, ce qui augmenterait considérablement le nombre de fluorophores par dendrimère donc l'intensité apparente de l'outil fluorescent.

La famille des rhodamines a toujours fait partie des chromophores les plus largement utilisés grâce à sa stabilité, sa réactivité, son intensité de fluorescence satisfaisante et son coût

très abordable par rapport à d'autres chromophores commerciaux¹⁴. Les dérivés de la rhodamine ont d'abord été utilisés pour la coloration des vêtements dans les industries textiles. Grâce à leurs propriétés de fluorescence uniques, ils ont ensuite été utilisés comme traceurs ou encore marqueurs fluorescents pour des études de structure microscopiques et également comme colorant pour le laser liquide¹⁵.

2.4.1 Monomère rhodamine-tyramine et sa cyclisation

La rhodamine B dont la structure est représentée ci-dessous (cf. Figure 2-7) est largement utilisée comme marqueur fluorescent en biologie¹⁶. Les dérivés de la rhodamine B possèdent des longueurs d'onde d'émission maximale aux alentours de 580 nm¹⁷. Ce fluorophore nous paraît intéressant étant donné son faible coût et son émission proche de la zone recherchée. De plus, la rhodamine B possède une fonction acide carboxylique que nous pourrions modifier afin de pouvoir la greffer à la surface du dendrimère.

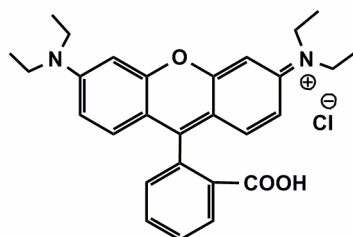


Figure 2-7 : Rhodamine B

Une méthode souvent utilisée au sein du laboratoire pour greffer les entités sur le dendrimère est l'introduction de la tyramine (cf. Figure 2-8) sur la molécule à greffer via l'amine primaire. Le groupement phénol de la tyramine permet ensuite de réaliser le greffage sur le dendrimère selon des méthodes classiques de synthèse.

¹⁴ Meng Q. H., Yu M. J., Zhang H. F., Ren J. C., Huang D. Y. *Dyes and pigments* **2006**, 73, 254

¹⁵ Amat-Guerri F., Costela A., Figuera J. M., Florido F., Sastre R. *Chem. Phys. Lett.* **1993**, 209, 352

¹⁶ <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes.html>

¹⁷ a) Yang X.-F., Guo X.-Q. and Li H. *Talanta* **2003**, 61, 439. b) Shiraishi Y., Miyamoto R., Zhang X. and Hirai T. *Org. Lett.* **2007**, 9, 3921.

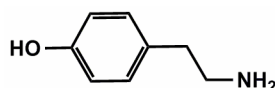


Figure 2-8 : Tyramine

La méthode de couplage peptidique envisagée est inspirée du protocole expérimental décrit par Qinghua Meng¹⁴ où la rhodamine B a été greffée sur la glycine. Cette méthode consiste en deux étapes : l'activation de l'acide carboxylique par la formation d'un ester suivie de la substitution nucléophile du groupement succinimide par la tyramine (cf. Figure 2-9).

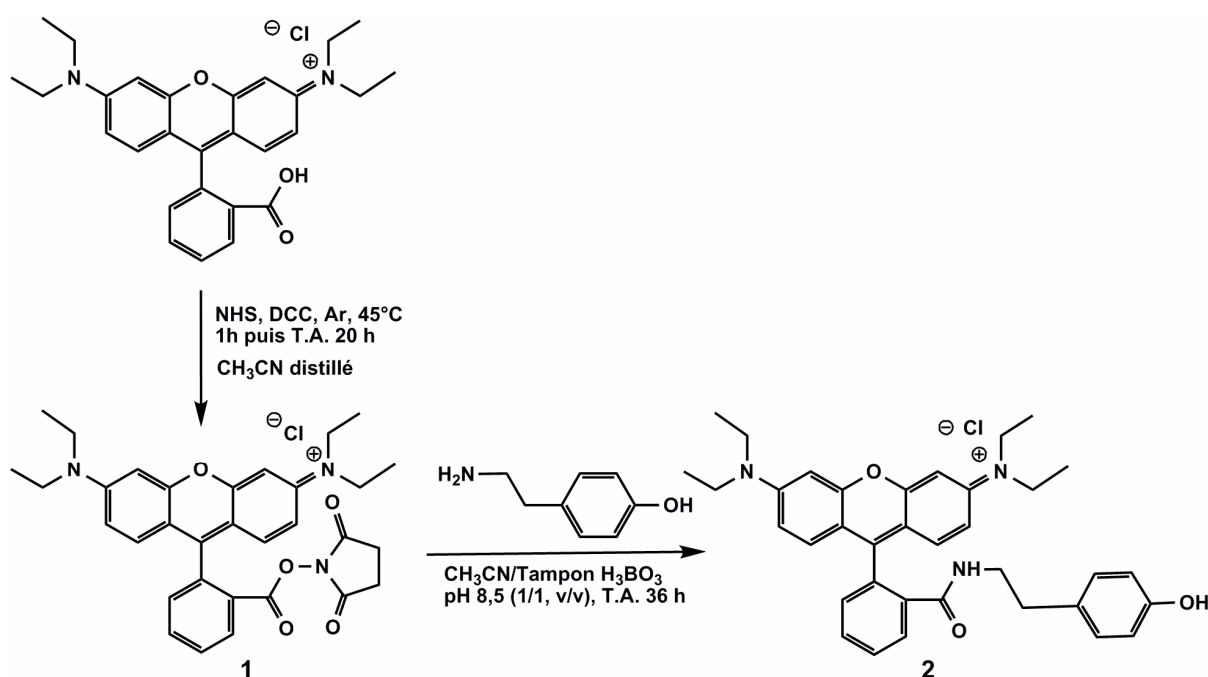


Figure 2-9 : Synthèse de la rhodamineB-tyramine

La première étape consiste en une estérification entre l'acide carboxylique de la rhodamine B et l'alcool du N-hydroxysuccinimide en milieu anhydre, en présence du DCC (cf. Figure 2-9). La réaction est suivie par CCM (chromatographie sur couche mince), et est finie au bout de 20 heures. L'ester de rhodamine B a été isolé par recristallisation dans l'éthanol absolu avec un rendement de 29 %. Il est caractérisé en RMN ¹³C par le déplacement du signal à 167,7 ppm correspondant au carbone de l'acide à 160,7 ppm correspondant au carbone de l'ester formé. Le produit est gardé sous atmosphère inerte car l'ester est sensible à l'hydrolyse. Pour introduire la tyramine, l'utilisation d'un mélange de solvants est nécessaire.

La tyramine est solubilisée dans le tampon borate à pH 8,5 afin de garder l'amine neutre, tandis que l'ester est solubilisé dans l'acétonitrile (cf. Figure 2-9). Les deux solutions sont ensuite mélangées pour mettre en contact les deux réactifs, la réaction est suivie par CCM. La purification du produit se fait par recristallisation suivie de la chromatographie sur colonne à gel de silice. Le produit obtenu est sous forme de poudre blanche et ne présente aucune propriété fluorescente, ce qui est totalement contraire à ce que nous attendions.

Des études récentes ont montré l'existence de deux formes, ouverte ou fermée¹⁸ en fonction de l'acidité du milieu, pour les dérivés de la rhodamine B. La forme ouverte est un très bon colorant et hautement fluorescente tandis que la forme fermée est totalement dépourvue de couleur et non fluorescente. Dans le cas présent, la cyclisation intramoléculaire se ferait selon le schéma ci-dessous (cf. Figure 2-10) :

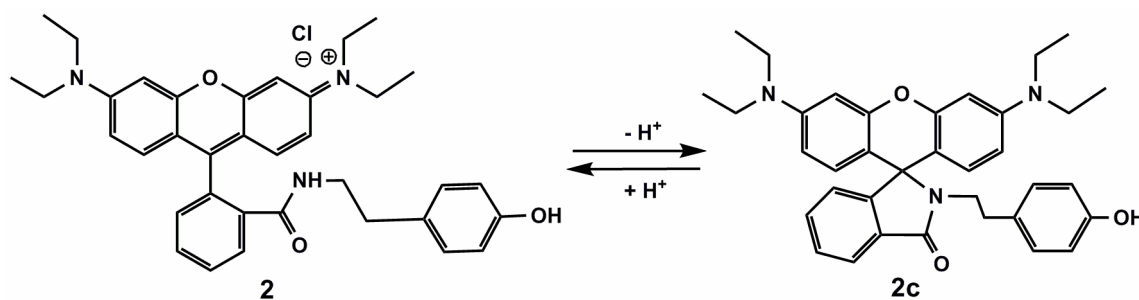


Figure 2-10 : Cyclisation réversible de la rhodamineB-tyramine

Le produit obtenu serait donc la forme fermée puisque c'est une poudre blanche. Le spectre de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ du produit montre un signal à 65,13 ppm correspondant au déplacement chimique du carbone spiro, ce qui permet de confirmer que le produit obtenu est sous sa forme fermée et d'expliquer l'absence de couleur et de fluorescence. Ceci n'est pas nécessairement sans intérêt pour des raisons suivantes :

- contrairement à sa forme ouverte, le composé **2c** sous forme fermée est soluble dans le THF et le chloroforme, les deux solvants les plus utilisés dans la synthèse du dendrimère, ce qui rendrait le greffage sur le dendrimère facile.

¹⁸ Maciej Adamczyk and Jonathan Grote. *Biorg & Med. Chem. Lett.* **2003** 13, 2327

- La protonation par HCl du dendrimère-rhodamine (Dendrimère-RB) *in situ* devrait rouvrir le cycle et rendre l'ensemble de nouveau fluorescent. En effet, il a été observé que l'ajout de l'acide chlorhydrique permet de redonner de la couleur au composé **2c**, donc d'ouvrir le cycle.

2.4.2 Dendrimère-RodamineB

Le greffage de la rhodamine sur le dendrimère de 1^{ère} génération a été réalisé selon le mode opératoire classique¹⁹ à l'exception de la température, dans le THF en présence du carbonate de césium à 50°C (cf. Figure 2-11). La réaction est suivie par RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$. L'apparition d'un signal à 68,5 ppm indique la substitution d'un seul atome de chlore sur les groupements thiophosphine ; lorsque celui-ci disparaît totalement au profit d'un signal à 62 ppm, la substitution est complète. Une centrifugation permet d'éliminer les sels et une précipitation dans un mélange pentane/éther diéthylique permet d'éliminer l'éventuel excès de rhodamine. Le dendrimère-RB est obtenu sous forme de solide blanc cassé, avec un rendement de 91 %.

¹⁹ Nathalie Launay, Anne-Marie Caminade, Jean-Pierre Majoral. *J. Organometallic Chemistry* **1997** 529, 51

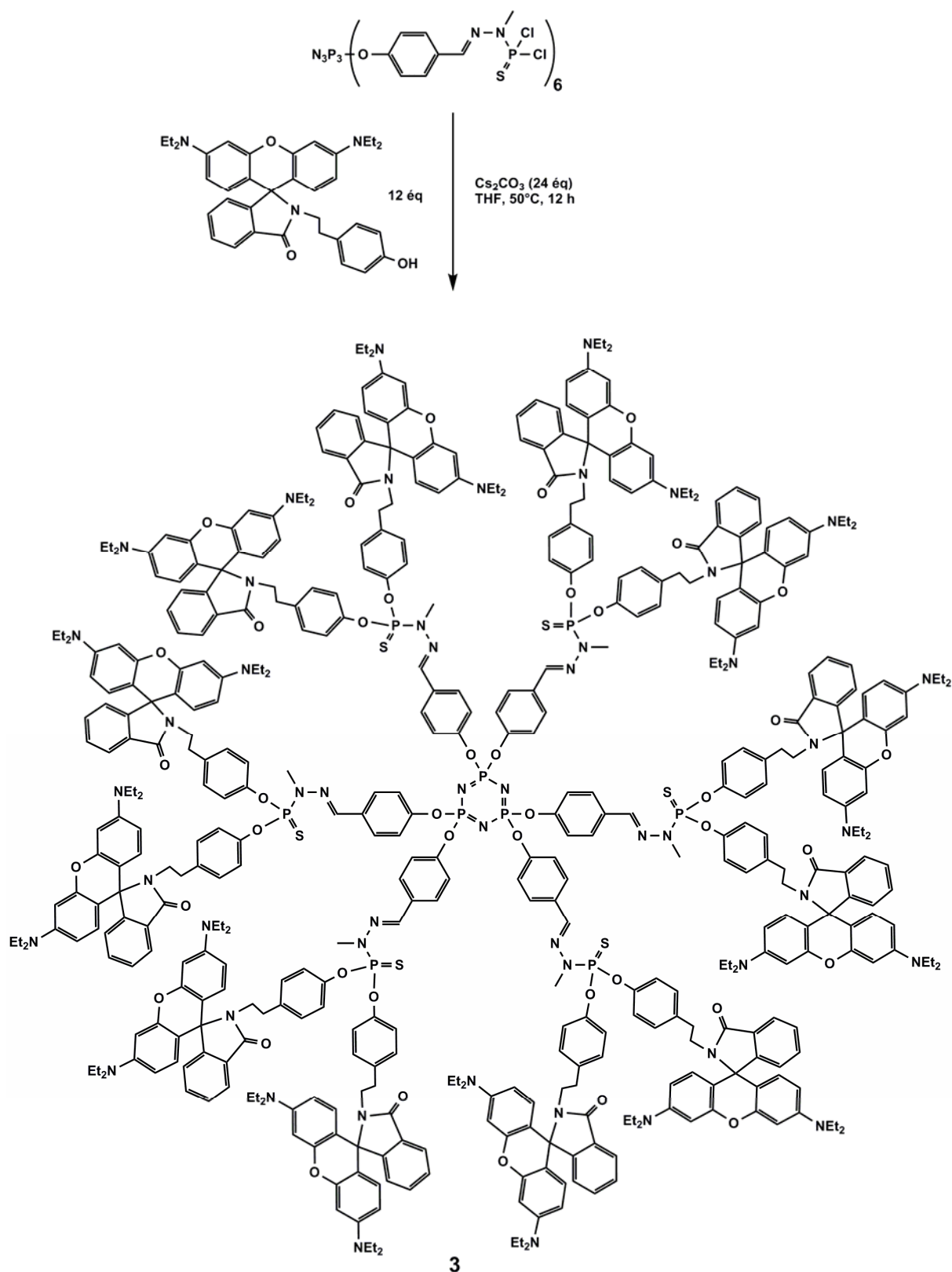


Figure 2-11 : Greffage de la rhodamine B-tyramine cyclisée sur le dendrimère phosphoré de 1^{ère} génération

Il reste à savoir si la réouverture du cycle dans la rhodamine sans affecter la structure dendritique est possible. Pour ce faire, une solution d'acide chlorhydrique à 0,1N dans l'eau a

été ajoutée à la solution de dendrimère-RB dans le THF. La quantité d'acide ajoutée est calculée pour protoner tous les motifs rhodamine. Une apparition de couleur rose est observée au bout de 1,5 heures et l'intensité augmente progressivement. L'analyse RMN ^1H et $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ au bout de 12 heures permet de confirmer que la structure dendritique n'est pas touchée, néanmoins le signal correspondant au carbone spiro est toujours visible, c'est-à-dire que tous les motifs rhodamine ne sont pas ouverts. Les ajouts ultérieurs d'acide n'ont pas permis une réouverture complète des motifs rhodamine. Il semblerait qu'un équilibre entre les deux formes soit établi dans les conditions utilisées (1,4 équivalents d'acide chlorhydrique ajoutés).

Les études spectroscopiques du dendrimère-RB ont été réalisées dans le DMSO car une fois partiellement protoné, ce dendrimère n'est soluble que dans le DMSO et des mélanges de solvants organiques/eau. Son rendement quantique dans le DMSO est de 3,6 % pour une excitation à 562 nm et une émission maximale à 582 nm. Le dendrimère-RB n'est clairement pas une solution viable pour l'objectif de l'imagerie *in vivo*.

Afin de résoudre le problème de cyclisation causant la perte de fluorescence, l'espaceur tyramine a été remplacé par la 4-hydroxyphénylpiperazine (cf. Figure 2-12) qui a une réactivité comparable :

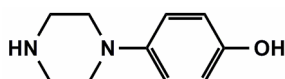


Figure 2-12 : 4-hydroxyphénylpiperazine

Le couplage peptidique avec la rhodamine B dans les mêmes conditions que pour la tyramine a été réalisé avec succès. La rhodamine-piperazine obtenue ne peut se cycliser puisque cette fois-ci l'atome d'azote n'est plus disponible pour former une liaison (cf. Figure 2-13). Le produit obtenu reste fluorescent, néanmoins, il n'a pas été possible de le greffer sur le dendrimère à cause d'un problème de solubilité. En effet, lorsque le dendrimère solubilisé dans le THF rencontre la rhodamine solubilisée dans l'acétonitrile, la substitution commence et des précipités se forment, ainsi la réaction s'arrête.

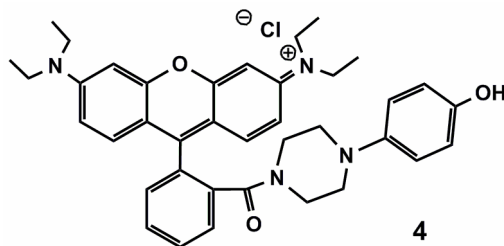


Figure 2-13 : RhodamineB-piperazine

2.5 Dendrimère pérylène

La voie du dendrimère-RB est sans issue, il est alors indispensable de trouver un autre fluorophore plus compatible.

2.5.1 Choix du fluorophore

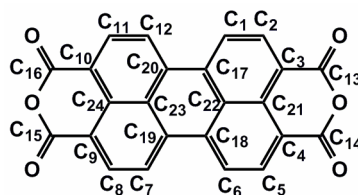


Figure 2-14 : Pérylène dianhydride

Les pérylène diimides synthétisés à partir de la forme dianhydride (cf. Figure 2-14) sont des composés très attractifs pour la synthèse de différents multichromophores grâce à leurs propriétés uniques telles que la stabilité chimique car ils peuvent résister à l'hydroxyde de potassium fondu à 220°C, à l'acide sulfurique concentré jusqu'à 220°C ainsi qu'à l'eau de Javel concentrée^{20,21}. De plus, ils présentent une bonne stabilité thermique jusqu'à 550°C²² et une grande photostabilité.

Les pérylènes ont été découverts en 1913 par Kardos²³ et ont été utilisés au début comme colorants dans les industries textiles puis comme pigments de très haute

²⁰ Heinz Langhals. *Helvetica Chimica Acta* **2005** 88, 1309

²¹ Heinz Langhals. *Heterocycles* **1995** 40, 477

²² To Xerox Corp., Jap. Pat. 03024959 A2, February 1st, **1991** (Chem. Abstr. **1991** 115, 123841a)

²³ M. Kardos, D. R. P. 276357, June 14, 1913 ; Friedländers Fortschr. Teerfarbenfabr. **1917**, 12, 492 ; (*Chem. Abstr.* **1914** 8, 3243)

performance²⁴, principalement pour les teintes rouge et violet noir. La solubilité particulièrement basse des pérylènes est essentielle pour leur application en teinture, mais a beaucoup limité leur développement en chimie. Ainsi, la fluorescence extraordinaire des dérivés pérylènes n'a été observée que dans les années 40 par Geissler et Remy²⁵, mais ces composés n'étaient pas exploitables à cause de leur solubilité extrêmement basse.

Récemment, l'introduction des groupements encombrants sur le pérylène au niveau des anhydrides a permis d'augmenter considérablement la solubilité des composés pérylène, et a ouvert ainsi de nouvelles possibilités de synthèse chimique à partir du pérylène pour diverses applications²⁶ telles que les cellules photovoltaïques²⁷, les diodes électro-luminescents organiques²⁸, l'inhibition de télomérase humaine²⁹ ou encore le laser³⁰.

Le cœur du pérylène peut être substitué par des accepteurs ou des donneurs d'électrons en positions 1, 6, 7 et 12 (cf. Figure 2-14), ce qui a pour conséquence de modifier les propriétés spectroscopiques du pérylène²⁰. Il est donc possible de contrôler la région spectrale des dérivés pérylène selon les besoins. Dans le cas présent, nous pouvons notamment introduire des donneurs d'électrons tels que des substituants amines³¹ qui auraient un effet

²⁴ M. Greene. *High Performance Pigment*. **2002** 249 (*Chem. Abstr.* **2002** 136, 403131)

²⁵ G. Geissler, H. Remy, to *Hoechst AG*, Ger. Offen. 1130099, October 14, 1959 (*Chem. Abstr.* **1962** 57, P11346 f)

²⁶ Frank Würthner, Vladimir Stepanenko, Zhijian Chen, Chantu R. Saha-Möller, Nikolaus Kocher, and Dietmar Stalke. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7933

²⁷ (a) Breeze A. J., Salomon A., Ginley D. S., Gregg B. A., Tillmann H., Hörhold H.-H. *Appl. Phys. Lett.* **2002**, 81, 3085. (b) Yakimov A., Forrest S. R., *Appl. Phys. Lett.* **2002**, 80, 1667. (c) Schmidt-Mende L., Fechtenkötter A., Müllen K., Moons E., Friend R. H., MacKenzie J. D. *Science* **2001**, 293, 1119

²⁸ (a) Angadi M. A., Gosztola D., Wasielewski M. R. *Mater. Sci. Eng. B.* **1999**, 63, 191. (b) Kraft A., Grimsdale A. C., Holmes A. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 402. (c) Ranke P., Bleyl I., Simmerer J., Haarer D., Bacher A., Schmidt H. W. *Appl. Phys. Lett.* **1997**, 71, 1332

²⁹ Macro Franceschin, Antonello Alvino, Giancarlo Ortaggi and Armandodoriano Bianco. *Tetrahedron letters* **2004**, 45, 9015

³⁰ (a) Gvishi R., Reisfeld R., Burshtein Z. *Chem. Phys. Lett.* **1993**, 213, 338. (b) Sadrai M., Hadal L., Sauers R. R., Husain S., Krogh-Jespersen K., Westbrook J. D., Bird G. R. *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 7988. (c) Reisfeld R., Seybold G. *Chimia* **1990**, 44, 295. (d) Löhmansröben H.-G., Langhals H. *Appl. Phys.* **1989**, B48, 44-452

³¹ (a) Langhals H., Kirner S. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 365. (b) Rudkevich M. I., Korotenko T. A. *Khar'kov. Politekh. Inst.* **1969**, 41, 21 (*Chem. Abstr.* **1971**, 75, 7375). (c) Zhao Y., Wasielewski W. M. R. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 7047

bathochrome pour amener la longueur d'onde d'émission du dérivé pérylène dans la zone proche-infrarouge.

2.5.2 *Synthèse du dendrimère pérylène*

2.5.2.1 Rétrosynthèse du monomère dérivé de pérylène

Pour être utilisable, le pérylène doit subir une série de modifications dans un ordre adéquat (cf. Figure 2-15). L'introduction des groupements donneurs d'électrons au cœur pérylène dans le but d'augmenter la longueur d'onde d'émission du composé se fait par une halogénéation suivie d'une réaction de substitution nucléophile. Grâce au doublet libre de l'atome d'azote, les substituants donneurs azotés permettent de déplacer la région spectrale des dérivés pérylène fluorescents vers 700 nm.

Comme la rhodamine, le dérivé pérylène diimide nécessite également un point d'ancrage pour être greffé sur le dendrimère. La tyramine serait l'intermédiaire idéal dans ce cas de figure. Ceci implique que les deux groupements amines introduits soient différents, ce qui rajoute une difficulté de plus à la synthèse organique. Il y a plusieurs possibilités pour introduire des groupements différents²⁰ :

- L'intuition voudrait que l'une des amines réagisse avec un large excès de pérylène dianhydride et les produits monosubstitués pourraient être séparés du reste. Seulement cette route est barrée d'avance car l'imidation des deux fonctions anhydrides se fait de manière simultanée, c'est-à-dire que soit la condensation a lieu des deux côtés, soit elle n'a pas lieu. Même dans les conditions extrêmement bien contrôlées, le pérylène imide anhydride ne peut être obtenu qu'en tant que produit très minoritaire.

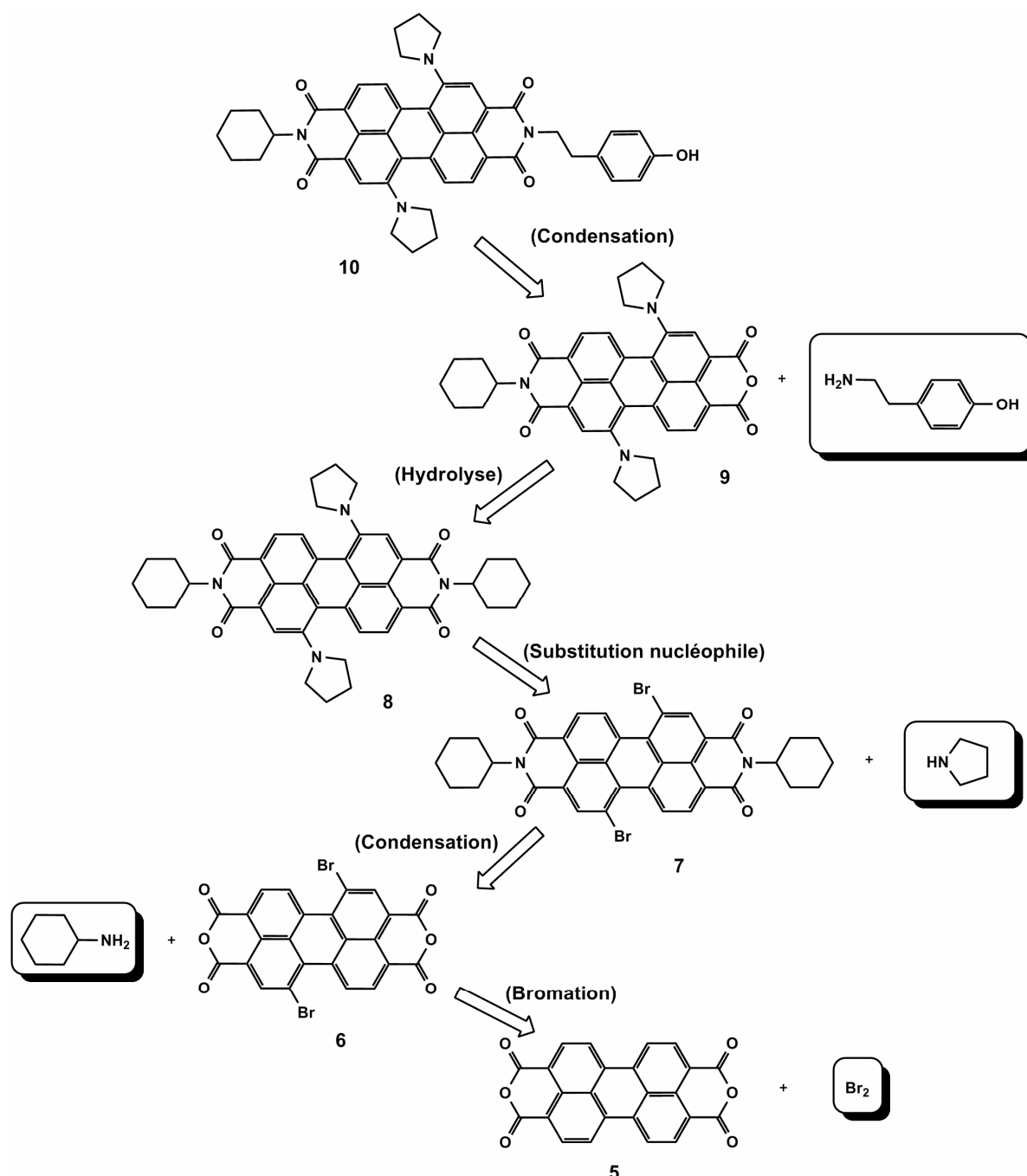


Figure 2-15 : Rétrosynthèse du pérylène dimide tyramine

- Le pérylène diimide dissymétriquement substitué peut être préparé par co-condensation de deux amines différentes. Néanmoins des rendements significatifs ne peuvent être obtenus que lorsque les réactivités des deux amines sont comparables. De plus, la séparation du composé asymétriquement substitué des deux autres composés symétriquement substitués pourrait être très difficile étant donné leur similitude structurale.

- La méthode la plus efficace est une méthode indirecte. L'hydrolyse en milieu basique du pérylène diimide symétriquement substitué par la première amine donne le pérylène imide anhydride qui pourrait ensuite se condenser avec la deuxième amine pour donner le pérylène diimide asymétrique. C'est cette méthode qui a été retenue avec la N-cyclohexylamine comme 1^{ère} amine et la tyramine comme seconde (cf. Figure 2-15).

2.5.2.2 Synthèse du monomère dérivé de pérylène

La synthèse du pérylène-tyramine est inspirée des travaux réalisés par Frank Würthner *et Coll.*³², par Chun-Chieh Chao *et Coll.*³³ et par Yuki Shibano *et coll.*³⁴. La première étape consiste en une bromation du cœur pérylène en position 1,7 (cf. Figure 2-16).

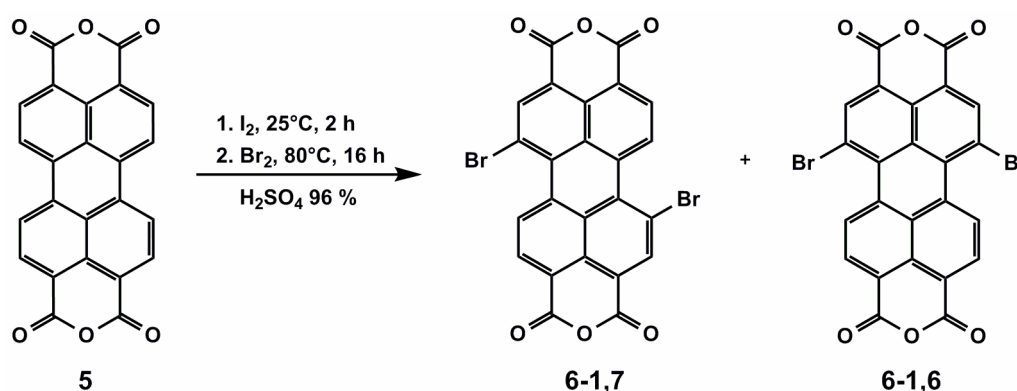


Figure 2-16 : Bromation du pérylène dianhydride

Cette réaction de substitution électrophile aromatique a été menée dans l'acide sulfurique à 96 % minimum, un des rares solvants capables de solubiliser le pérylène dianhydride **5**. Après l'activation par une quantité catalytique d'iode pendant 2 heures à 25°C, le brome a été ajouté goutte à goutte à la solution à 80°C. La réaction est arrêtée au bout de 16 h sans aucun suivi étant donné le problème de solubilité du produit. Une très grande quantité d'eau glacée a été ajoutée au mélange afin de précipiter le produit dibromé qui est isolé par

³² Würthner F., Stepanenko V., Chen Z., Saha-Möller C. R., Kocher N. and Stalke D. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7933-7939

³³ Chao C.-C., Leung M.-K. Su Y.O., Chiu K.-Y., Lin T.-H., Shieh S.-J. and Lin S.-C. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 4323-4331

³⁴ Shibano Y., Umeyama T., Matano Y. and Imahori H. *Org. Lett.* **2007**, 9, 1971-1974

filtration. Le produit brut obtenu est en réalité un mélange et doit contenir à la fois le composé **6-1,7**, dibromé en positions 1,7 et le composé **6-1,6**, dibromé en positions 1,6 puisque la bromation n'est pas régio-sélective. La purification est impossible à ce stade à cause de la solubilité extrêmement basse du produit, le produit brut est par conséquent utilisé tel quel à l'étape suivante.

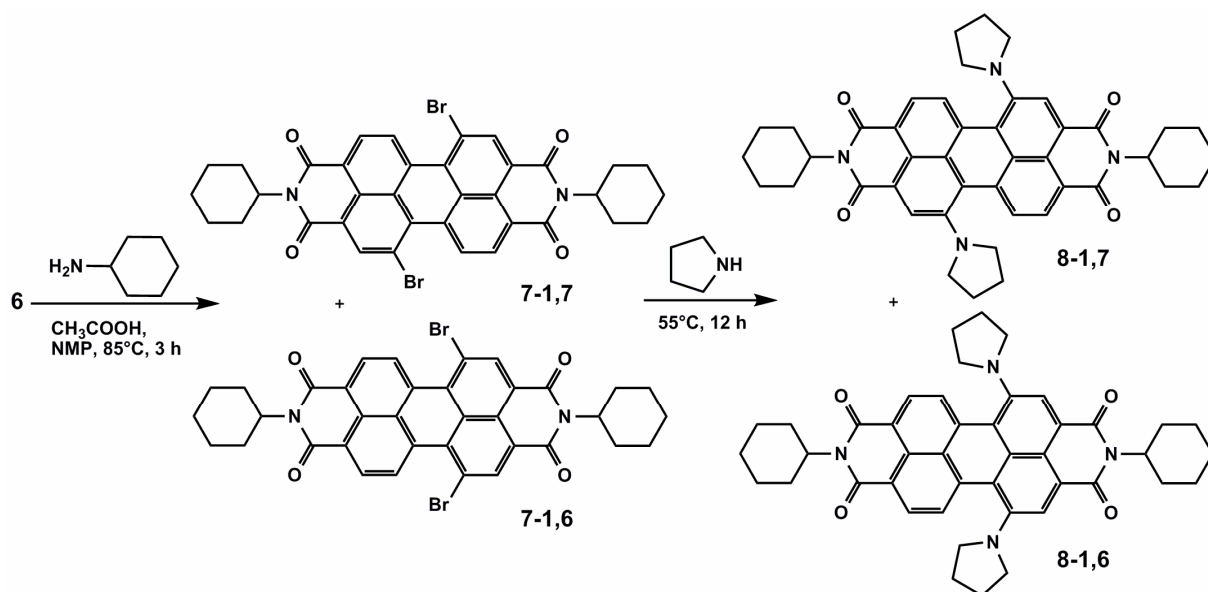


Figure 2-17 : Condensation et substitution du pérylène

Ce n'est qu'après la condensation de la N-cyclohexylamine au niveau des anhydrides (cf. Figure 2-17) que le dérivé pérylène (composé **7**) devient soluble dans les solvants organiques. Après 3 heures de réaction, le mélange est refroidi à température ambiante et forme des précipités qui sont récupérés par filtration. Ces précipités sont lavés avec du méthanol qui permet d'éliminer les traces de NMP (N-méthylepyrrolidinone) et d'acide acétique. Le produit brut est ensuite solubilisé dans le dichlorométhane et les impuretés insolubles sont éliminées par filtration. Le produit brut est purifié par colonne chromatographie sur colonne à gel de silice et est caractérisé par un signal triplet de triplet à 5,04 ppm en RMN ^1H (CDCl_3) correspondant aux CH_2 des atomes d'azote sur les cycles hexyle et par un signal singulet à 54,26 ppm en RMN ^{13}C (CDCl_3) correspondant au carbone tertiaire des cycles hexyle. Le spectre de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) permet de mettre en évidence la présence de l'isomère **7-1,6** en quantité très minoritaire (cf. Figure 2-18) et d'estimer sa proportion à 6 %. Néanmoins ces deux isomères ne peuvent pas être séparés par

chromatographie sur colonne et sont donc utilisés tels quels pour l'étape suivante sans séparation.

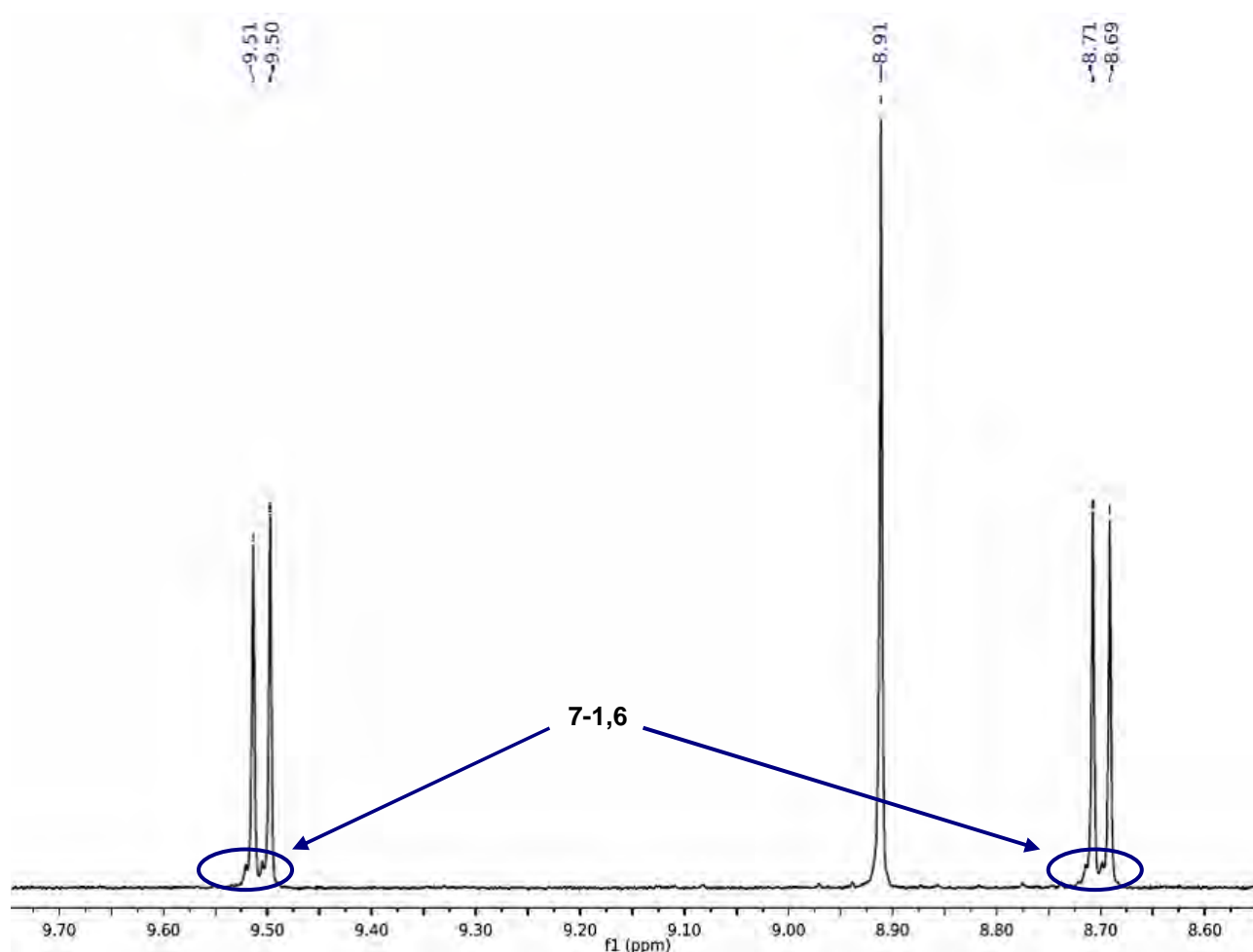


Figure 2-18 : Zone aromatique de la RMN ^1H (CDCl_3) des isomères 7-1,7 et 7-1,6, les épaulements en bas des doublets correspondent à l'isomère 7-1,6

La substitution nucléophile des atomes de brome par la pyrrolidine se fait en mélangeant les isomères **7-1,7** et **7-1,6** avec la pyrrolidine en large excès qui sert en même temps de solvant. Le mélange réactionnel est agité à 55°C pendant 12 heures. Un changement de couleur du milieu réactionnel (orange fluo → vert foncé) est observé très rapidement. La réaction est suivie par CCM et la disparition de la tache orange au profit d'une tache verte indique la fin de la réaction. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi et acidifié avec l'acide chlorhydrique à 10 % afin de protoner la pyrrolidine en excès. Une extraction au dichlorométhane suivie de deux purifications par chromatographie (sur colonne à gel de silice

puis sur colonne à gel d'alumine) permet de récupérer les composés **8-1,7** et **8-1,6** toujours mélangés.

La séparation de ces deux isomères s'avère extrêmement difficile, des essais de purification par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase normale et en phase inverse n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Seule la chromatographie chirale semble efficace bien que ce ne soit que des régio-isomères. Une petite quantité (20 mg) de ces isomères a été séparée sur une colonne de chromatographie chirale (ChiralCel OD) analytique (cf. Figure 2-19) afin d'étudier les propriétés optiques de chacun. (cf. Figure 2-20).

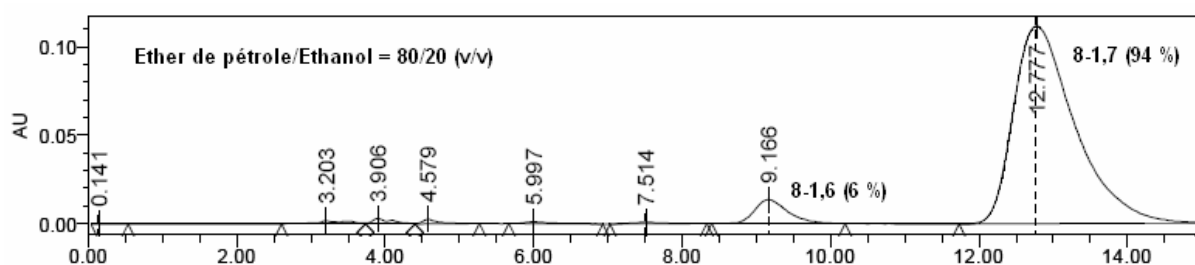


Figure 2-19 : Chromatogramme de la séparation des isomères **8-1,7** et **8-1,6**

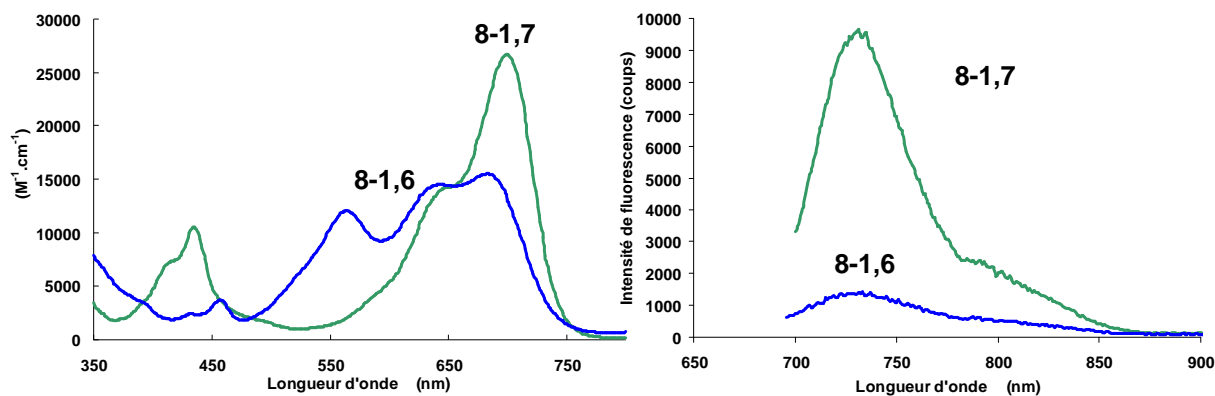


Figure 2-20 : Etudes spectroscopiques des deux isomères dans le chloroforme. Gauche : absorbance ; droite : fluorescence. Courbe bleue : isomère **8-1,6** ; courbe verte : isomère **8-1,7**

Le résultat de la séparation a permis de déterminer les proportions des deux isomères dans le mélange. Le composé **8-1,6** minoritaire sous forme de poudre bleue représente 6 % tandis que le composé **8-1,7** majoritaire sous forme de poudre verte représente 94 %. Les spectres d'absorption ayant des profils différents prouvent qu'il s'agit bien de deux composés différents. Les mesures de fluorescence montrent que ces deux composés isomères possèdent la même longueur d'onde d'émission (731 nm) dans le chloroforme mais avec des rendements

quantités différents : 25 % pour le composé **8-1,7** contre 5 % pour le composé **8-1,6**. La connaissance des quantités relatives des deux isomères ainsi que leurs propriétés optiques respectives nous a permis de décider de poursuivre la synthèse sans la séparation des deux isomères. En effet, le composé **8-1,6** n'est présent qu'à 6 % et émet à la même longueur d'onde que le composé principal **8-1,7**, sa présence ne pose donc aucun problème tant au niveau des caractérisations qu'au niveau de l'application. Dans le but de faciliter l'écriture et la compréhension, désormais seul l'isomère 1,7 est représenté.

L'hydrolyse partielle du composé **8** se fait dans un mélange isopropanol/eau (1/1, v/v) à reflux pendant 2,75 heures en présence de 50 équivalents d'hydroxyde de potassium par rapport au composé **8** (cf. Figure 2-21). La réaction est suivie par CCM et l'apparition d'une tache différente du composé **8** indique l'avancement de l'hydrolyse partielle. La prolongation du temps de réaction ainsi que l'augmentation de la quantité de base provoqueraient l'hydrolyse complète des imides³². Après acidification du mélange réactionnel avec l'acide acétique pur et l'extraction au dichlorométhane, le composé **9** est récupéré par chromatographie sur colonne à gel de silice avec un rendement de seulement 35 %.

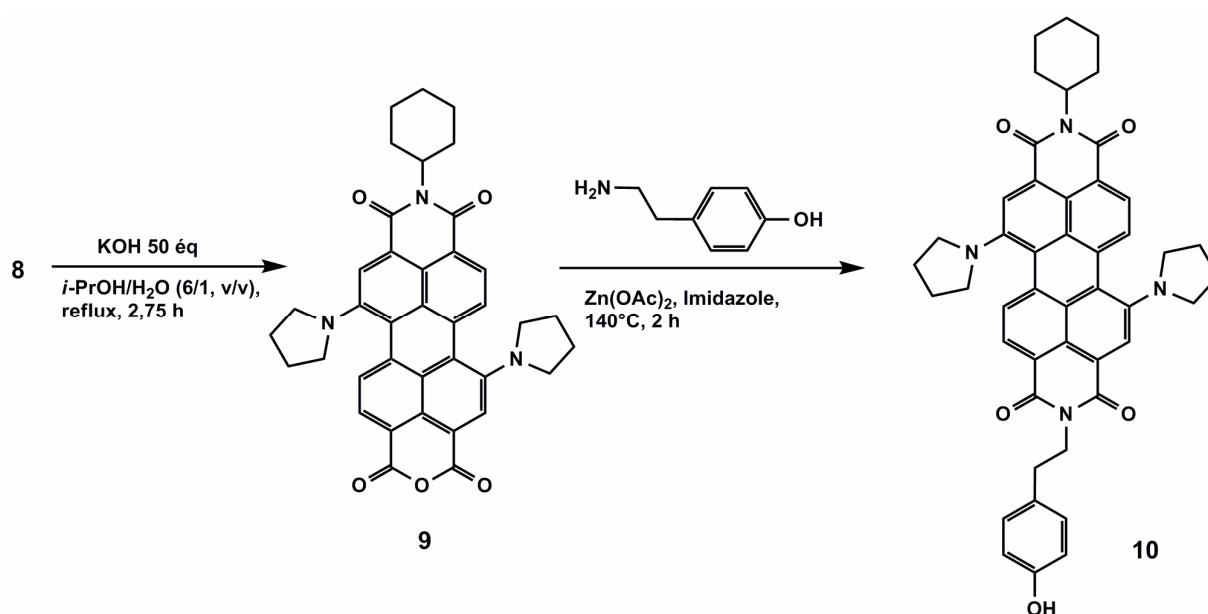


Figure 2-21 : Hydrolyse partielle du pérylène diimide et la condensation du pérylène monoanhydride pour l'obtention du pérylène diimide tyramine

L'obtention du composé **9** monoimide est confirmée par le signal de forme triplet de triplet à 5 ppm en RMN ^1H correspondant au proton du cycle hexyle en de l'atome de l'azote. Ce signal qui intégrait pour deux protons n'intègre plus que pour un seul proton.

La dernière étape consiste à l'imidation de l'anhydride libre avec la tyramine. La réaction se fait à 140°C pendant 2 heures, en présence de l'acétate de zinc et dans l'imidazole qui est, une fois fondu, le solvant de la réaction. Il est difficile de suivre la réaction étant donné l'aspect solide du mélange réactionnel à des températures inférieures à 120°C. Le mélange réactionnel est refroidi à température ambiante et se solidifie. L'acide chlorhydrique 1N est ajouté au solide et le tout est placé aux ultra-sons pendant 35 minutes jusqu'à l'obtention d'une suspension afin de solubiliser et neutraliser l'imidazole. Une extraction au chloroforme suivie d'une chromatographie sur colonne à gel de silice permet d'obtenir le composé **10** avec un rendement de 92 %.

Un phénomène intéressant a été observé lors de la synthèse et de la caractérisation spectroscopique du composé **10**. Pour des concentrations très différentes du même composé **10**, les spectres RMN ^1H sont également très différents. Les formes des signaux correspondent parfaitement à la structure du composé mais les déplacements chimiques peuvent être inversés d'un spectre à l'autre. Ceci pourrait s'expliquer par l'association des molécules de pérylène entre elles par interaction π - π , ce qui modifie l'environnement des molécules et par conséquent les déplacements chimiques des atomes qui les constituent. Cette hypothèse d'interaction entre les molécules du composé **10** a été vérifiée par des expériences de RMN diffusion (DOSY). Pour ce faire, une gamme de concentrations allant de 46,5 mM (concentration à la saturation) à 1,2 mM (concentration limite pour pouvoir réaliser l'expérience) de composé **10** dans le chloroforme deutéré a été étudié en RMN (cf. Figure 2-22). Le coefficient de diffusion D est directement lié à la taille de l'objet dans la solution par l'équation de Stokes-Einstein $R_H = k_B T / 6 \pi \eta D$ (valable pour des particules sphériques) où k_B est la constante de Boltzmann, T la température exprimée en Kelvin, et η la viscosité dynamique de la solution. Par conséquent, à température et viscosité égale, le coefficient de diffusion est inversement proportionnel à la taille de l'objet. Plus les molécules du composé **10** s'associent pour former de plus gros objets, moins le coefficient de diffusion sera grand.

Afin de s'affranchir de la valeur de viscosité de la solution qui est inconnue, une référence interne (TMS) dont la taille est invariable (1,9 Å) a été introduite dans chaque échantillon. Cette technique sera expliquée plus en détail dans le chapitre V. La courbe représentant la variation du rayon hydrodynamique en fonction de la concentration en composé **10** (cf. Figure 2-22 Gauche) montre que la taille des objets en solution augmente lorsque la concentration augmente. Ce résultat est tout à fait normal puisque les fortes concentrations favorisent les interactions mutuelles des molécules. Les coefficients de diffusion mesurés ainsi que les profils en RMN ^1H pour les deux concentrations extrêmes sont représentés par l'insert de la figure ci-dessous (cf. Figure 2-22 Droite). Une grande différence des déplacements chimiques dans la zone aromatique est nette, attestant ainsi l'implication de ces cycles aromatiques dans les interactions entre les molécules, ce qui confirme l'hypothèse de l'interaction π - π entre les molécules de pérylène **10**. Par ailleurs, contrairement à ce que nous aurions pu penser, il ne semble pas exister, pour ce composé pérylène, un seuil de concentration à partir duquel les associations commencent, dans la gamme de concentrations étudiée (cf. Figure 2-22 Gauche).

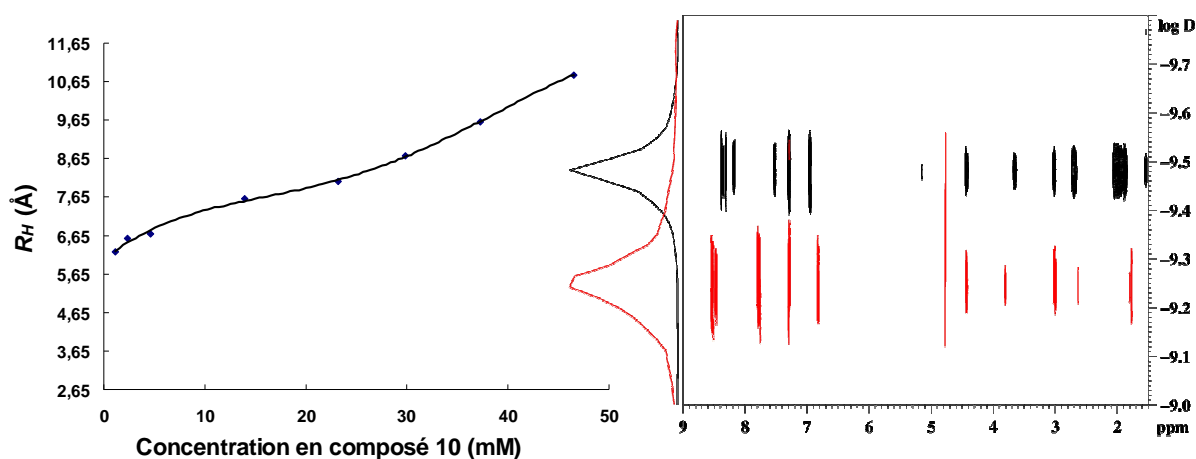


Figure 2-22 : Etudes en RMN diffusion (DOSY) du composé **10**. Gauche : Rayon hydrodynamique R_H en fonction de la concentration du composé **10** dans le chloroforme, Droite : comparaison des profils en RMN ^1H et des coefficients de diffusion D des échantillons le plus concentré (46,5 mM, en noir) et le moins concentré (1,2 mM, en rouge)

2.5.2.3 Greffage du monomère dérivé du pérylène sur le dendrimère

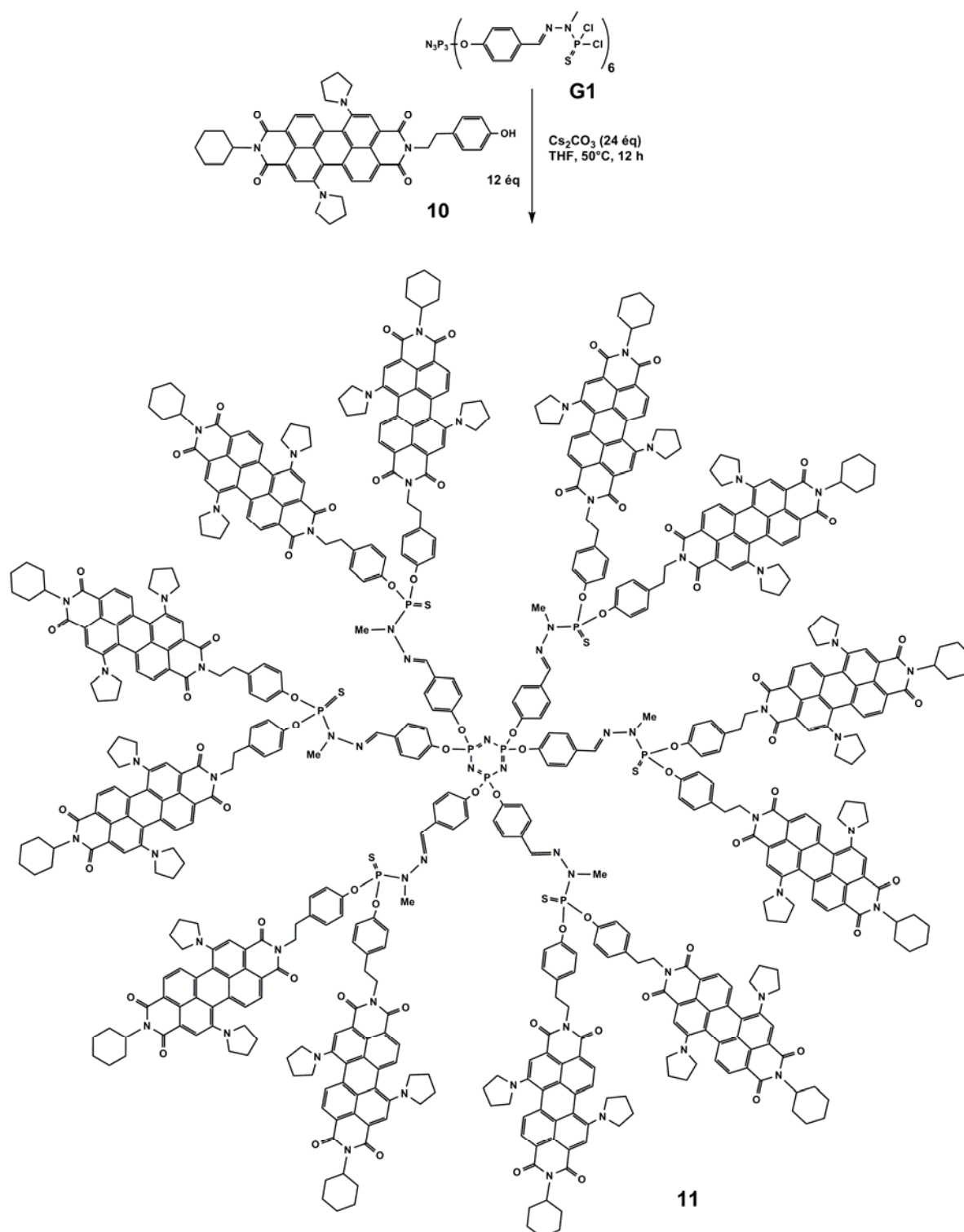


Figure 2-23 : Synthèse du dendrimère de 1^{ère} génération avec 12 motifs pérylène à la surface

Le dérivé pérylène tyramine **10** a été greffé sur un dendrimère de 1^{ère} génération selon le mode opératoire classique de croissance dendritique¹⁹, en présence du carbonate de césium

dans le THF distillé (cf. Figure 2-23). L'agitation du mélange réactionnel à température ambiante pendant 12 heures ne conduit qu'à la monosubstitution des groupements thiophosphine qui se traduit par un signal à 68 ppm en RMN ^{31}P . L'augmentation de la température jusqu'à 50°C du mélange réactionnel permet une réaction complète en s'affranchissant des encombrements stériques liés à la quantité importante des motifs pérylènes à la surface du dendrimère sans affecter la structure dendritique. La fin de la réaction est indiquée en RMN ^{31}P par la disparition complète du signal à 68 ppm au profit d'un signal à 63 ppm. La purification du produit brut se fait selon la méthode classique, par une filtration suivie des lavages par précipitation à répétition. L'élimination du monomère pérylène **10** résiduel est facilement suivie par CCM. Le dendrimère-pérylène **11** est obtenu sous forme de solide avec un rendement quasi-quantitatif.

2.5.3 Synthèse du dendri- pérylène incorporant un bras espaceur

Il a été montré que le monomère pérylène-tyr **10** peut être greffé à la surface du dendrimère, il est alors possible de concevoir un dendrimère fluorescent comportant à la fois des motifs pérylène et un bras-espaceur capable d'accrocher l'anticorps (cf. Figure 2-24). L'anticorps étant au moins 10 fois plus volumineux que la partie dendritique, il devrait assurer la solubilité de l'ensemble dans les milieux aqueux.

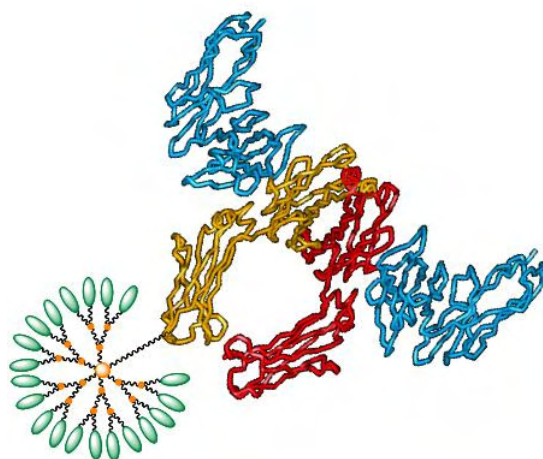


Figure 2-24 : Schéma symbolique du dendri-pérylène incorporant un anticorps

En dehors d'une chaîne suffisamment longue, le bras-espaceur doit également posséder deux points d'ancrage : une fonction phénol permettant son greffage au dendrimère et une fonction carboxylique capable de former une liaison peptidique avec l'anticorps sachant que ce dernier est riche en amine. Un tel bras-espaceur a déjà été réalisé au sein de notre équipe par Olivier Rolland lors de sa thèse (cf. Figure 2-25). L'acide carboxylique est protégé pour faciliter le greffage de ce bras-espaceur sur le dendrimère, il pourra être libéré avant le couplage à l'anticorps par l'acide trifluoroacétique qui n'a pas d'effet négatif sur la structure dendritique³⁵.

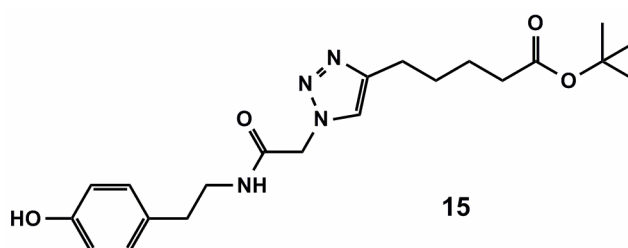


Figure 2-25 : Bras-espaceur pour l'accrochage d'une entité biologique au dendrimère

2.5.3.1 Synthèse du bras-espaceur

La synthèse du bras-espaceur est décrite ci-dessous (cf. Figure 2-26). Le point clé de la synthèse du bras-espaceur consiste en la cycloaddition de Huisgen entre l'azoture dérivé de la tyramine **13** et l'alcyne porté par l'ester dérivé de l'acide 6-heptynoïque **14**.

³⁵ Rolland O. Université Paul Sabatier. Thèse **2007**

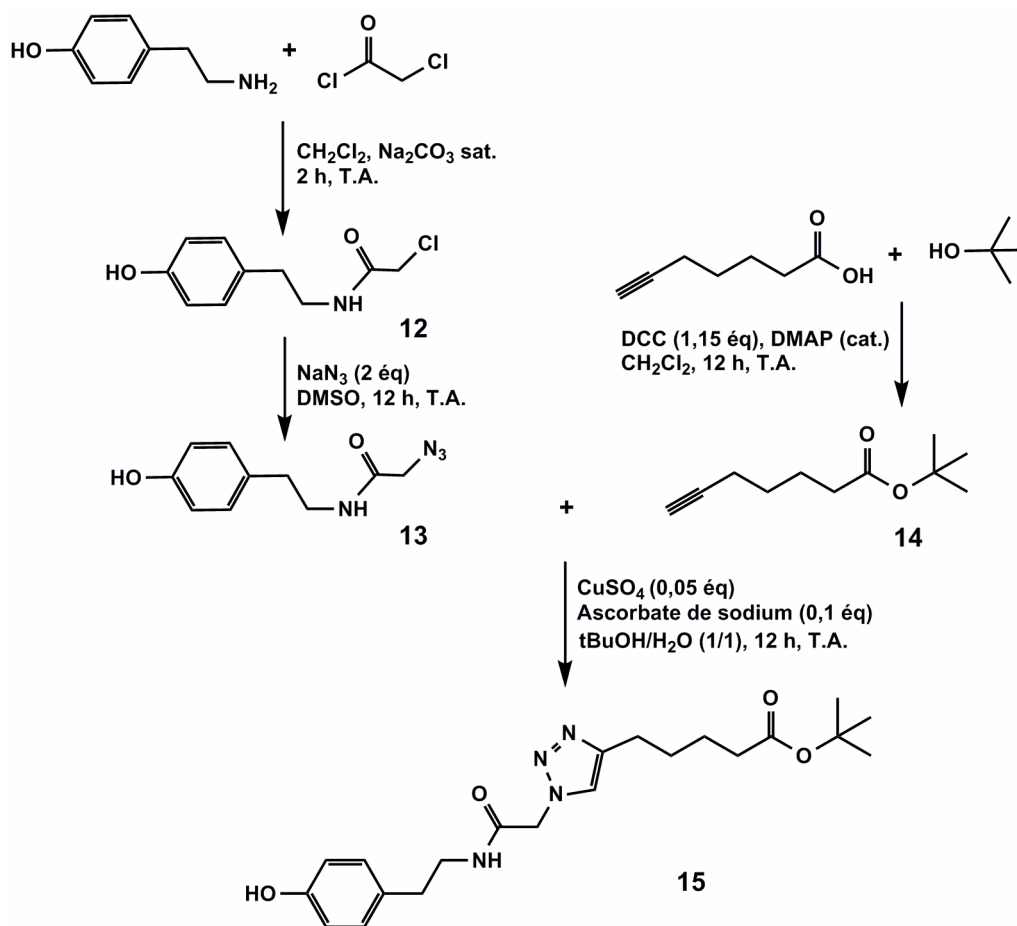


Figure 2-26 : Synthèse du bras-espaceur

L'azoture dérivé de la tyramine **13** est obtenu en 2 étapes : une chloroacétylation suivie d'une substitution nucléophile. La chloroacétylation de la tyramine par le chlorure de chloroacétyle se fait dans les conditions de transfert de phase avec un mélange dichlorométhane/solution aqueuse de carbonate de sodium saturée (1/1, v/v). Le composé **12** est obtenu avec un bon rendement (75 %) et est caractérisé en RMN ^1H par un signal singulet à 4,03 (DMSO- d_6) ppm ou à 3,80 (CDCl $_3$) ppm correspondant aux protons acétyl méthylène et en RMN ^{13}C par un signal à 41,2 (CDCl $_3$) ppm correspondant au carbone secondaire portant ces protons acétyl méthylène. La substitution nucléophile de l'atome de chlore du composé **12** par un azoture, ici fourni par l'azoture de sodium, donne l'azoture **13** sous forme d'huile visqueuse qui a tendance à cristalliser avec un très bon rendement (90 %). Par rapport au composé **12**, les signaux correspondant à l'acétyl méthylène du composé **13** sont déblindés (CDCl $_3$), de 0,15 ppm pour les protons (3,95 ppm) et de 11 ppm pour le carbone (52,6 ppm).

La protection de l'acide 6-heptynoïque par un groupement *tert*-butyle est menée dans le dichlorométhane en présence de DMAP (4-diméthylaminopyridine) en quantité catalytique et de DCC (N,N'-dicyclohexylcarbodiimide). L'ester *tert*-butyle **14** est obtenu après une chromatographie sur colonne à gel de silice sous forme d'huile incolore avec un rendement de 56 %.

La cycloaddition de Huisgen entre l'azoture **13** et l'alcyne terminal de l'ester **14** est catalysée par le Cu^I, généré *in situ*, dans un mélange de *tert*-butanol/eau (1/1, v/v). Malgré l'insolubilité des produits de départ dans ce mélange, la réaction a eu lieu avec succès et donne un produit brut toujours insoluble dans le mélange. Le composé **15** est isolé après une extraction suivie d'une chromatographie sur colonne à gel de silice sous forme de solide gluant avec un rendement de 82 %. Il est caractérisé en RMN ¹H (CDCl₃) par un signal singulet à 7,38 ppm correspondant au proton du cycle triazole.

2.5.3.2 Synthèse d'un nouveau dendrimère-pérylène incorporant le bras-espaceur

Alors que la substitution spécifique d'un seul atome de chlore par un phénol sur un dendrimère phosphoré de 1^{ère} génération est quasiment impossible, il a été montré que la mono- et la penta-substitution du cycle triphosphazène par des phénols sont contrôlables et les produits peuvent être isolés avec des rendements acceptables³⁶. L'incorporation du bras-espaceur **15** doit donc se faire directement sur le cœur hexachlorocyclotriphosphazène et conduit ainsi à la formation d'un système AB₅ (cf. Figure 2-27). La croissance dendritique peut ensuite se faire normalement jusqu'au greffage du dérivé pérylène-tyr **10** à la surface.

La synthèse du système AB₅ **17** peut se faire de deux façons : soit la monosubstitution sur le cœur hexachlorocyclotriphosphazène par le bras-espaceur **15** suivie de la substitution des 5 atomes de chlore restants par le 4-hydroxybenzaldéhyde; soit dans le sens inverse, la pentasubstitution sur le cœur par le 4-hydroxybenzaldéhyde suivie de la substitution de

³⁶ Chandrasekhar V. *Inorganic and Organometallic Polymers* ; Springer : Berlin Heidelberg, 2005

l'atome de chlore restant par le bras-espaceur **15**. C'est la deuxième méthode qui a été choisie pour cette synthèse étant donné que le composé **15** est ici le réactif limitant en termes de disponibilité. En effet, l'étape de monosubstitution du bras-espaceur **15** sur le cœur hexachlorocyclotriphosphazène aurait comme sous-produit entre autre la disubstitution et le cœur non substitué, ce qui entraînerait une perte de produit **15**.

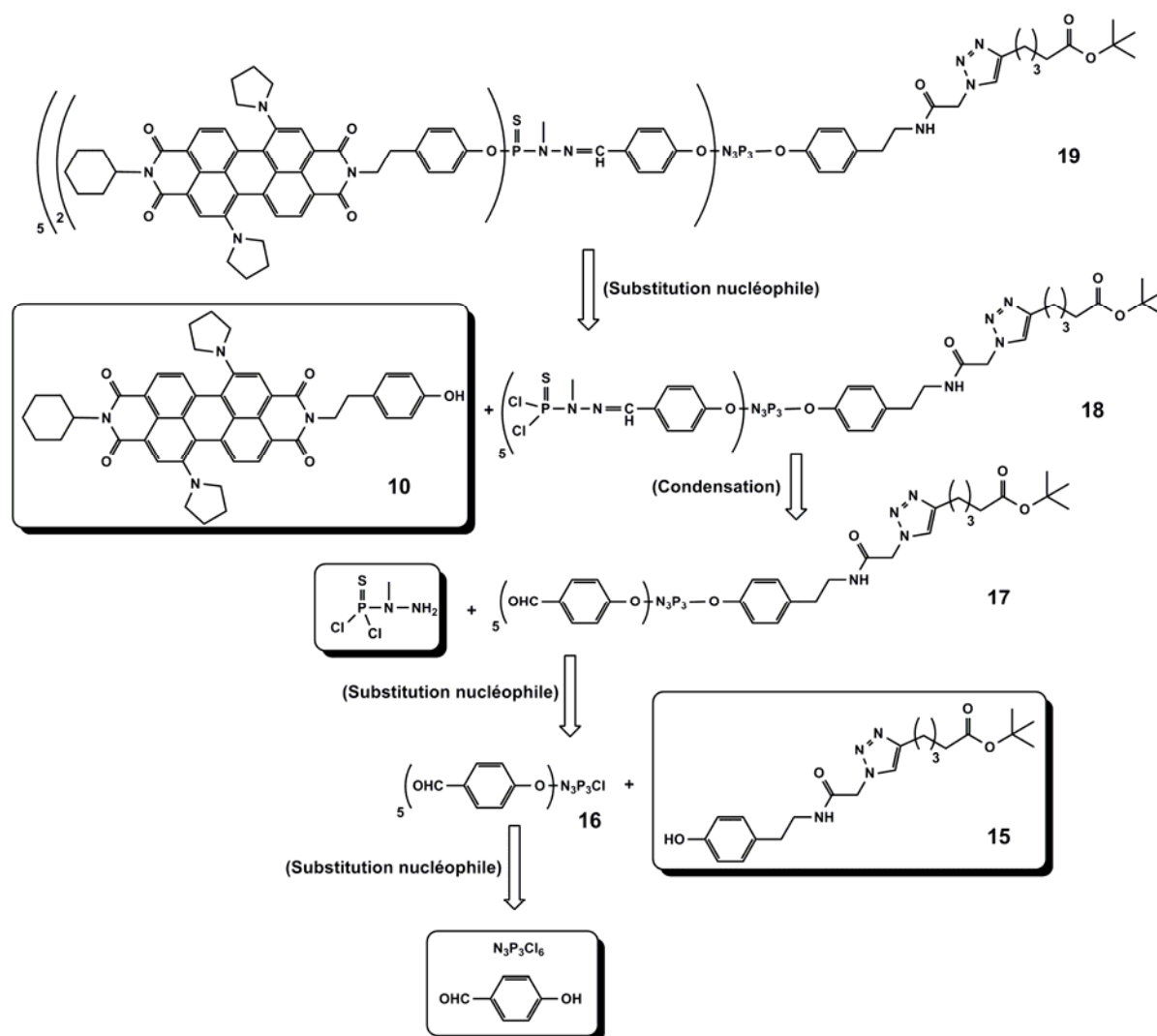
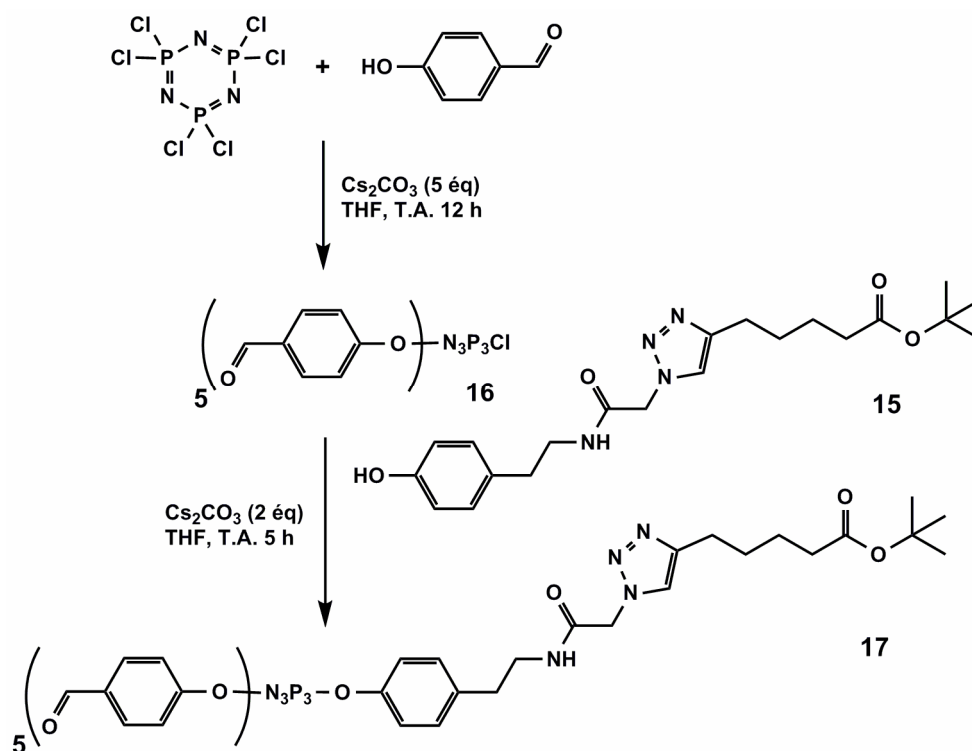


Figure 2-27 : Rétrosynthèse du dendri-pérylène de 1^{ère} génération incorporant le bras-espaceur

Figure 2-28 : Synthèse du dendrimère AB₅ incorporant le bras-espaceur

La pentasubstitution sur le cœur hexachlorocyclotriphosphazène par le 4-hydroxybenzaldéhyde se fait généralement en présence de l'hydruire de sodium et donne un mélange de dérivés tétra-, penta- et hexa-substitués. La séparation des trois est possible mais assez difficile, en particulier pour les penta- et hexa-substitués. Dans le cas présent, l'hydruire de sodium a été remplacé par le carbonate de césium (cf. Figure 2-28) et il semblerait que ce dernier favorise la formation des dérivés tétra- et penta-substitués et faciliterait ainsi la purification. Le produit penta-substitué **16** est caractérisé en RMN ³¹P (CDCl₃) par un doublet à 5,21 ppm correspondant aux deux atomes de phosphore disubstitués et un doublet de doublet à 20,79 ppm correspondant à l'atome de phosphore monosubstitué. Après une chromatographie sur colonne à gel de silice, le composé **16** est isolé sous forme d'huile très visqueuse avec un rendement de 76 %. Le dernier atome de chlore est ensuite substitué par le bras-espaceur **15** précédemment synthétisé, toujours en présence du carbonate de césium, dans le THF à température ambiante. La réaction est suivie en RMN ³¹P, la disparition du doublet à 5,21 ppm et du doublet de doublet à 20,79 ppm au profit d'un singulet à 7,37 ppm (C₆D₆) indique la fin de la réaction. Le dendrimère de génération 0 incorporant le bras-espaceur **17** est obtenu après la chromatographie sur colonne à gel de silice avec un rendement

relativement mauvais (37 %). Il y a sans doute eu de la dégradation du produit au contact de la silice acide.

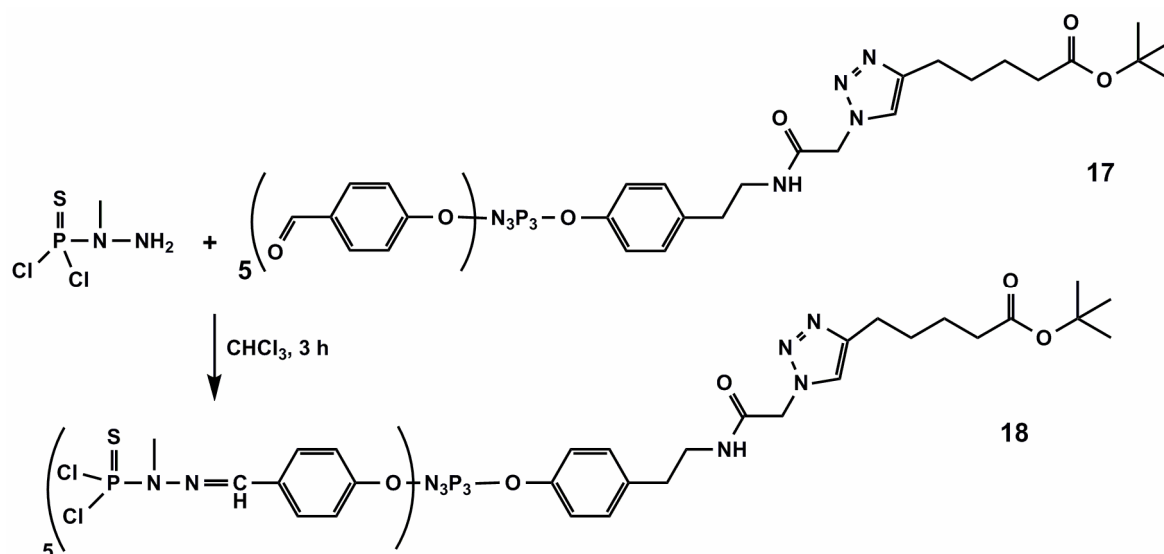


Figure 2-29 : Croissance dendritique du système AB_5

La condensation du phosphorhydrazide sur les 5 extrémités aldéhyde du dendrimère dans le chloroforme conduit au dendrimère AB_{10} **18** (cf. Figure 2-29) qui est caractérisé par de nouveaux signaux très proches vers 62,5 ppm correspondant aux atomes de phosphore en périphérie. L'excès de phosphorhydrazide est éliminé par la technique de lavage/précipitation et le composé AB_{10} **18** est obtenu avec un rendement quasi-quantitatif.

Le greffage du monomère pérylène **10** sur le dendrimère AB_{10} **18** portant 10 extrémités chlore se fait comme sur un dendrimère de 1^{ère} génération classique¹⁹, en présence du carbonate de césium dans le THF distillé. La réaction semble évoluer plus rapidement que dans le cas d'un dendrimère classique de 1^{ère} génération portant 12 extrémités à la surface, la réaction est terminée en 12 heures à 25°C au lieu de 50°C. Ce résultat est logique car l'encombrement stérique généré par les monomères pérylène à la surface du dendrimère est moins important dans le cas d'un dendrimère avec 10 extrémités que dans le cas où le dendrimère porte 12 extrémités, d'où la facilité de greffage dans le cas du système AB_{10} . L'obtention du dendrimère AB_{10} -pérylène **19** (cf. Figure 2-30) est confirmée par la spectroscopie RMN ^{13}C (CDCl_3) où un grand signal à 121,53 ppm correspondant aux carbones tertiaires en position ortho du phénol greffé est observé. L'excès du monomère peut

être détecté par CCM et est facilement éliminé par la chromatographie sur colonne à gel de silice.

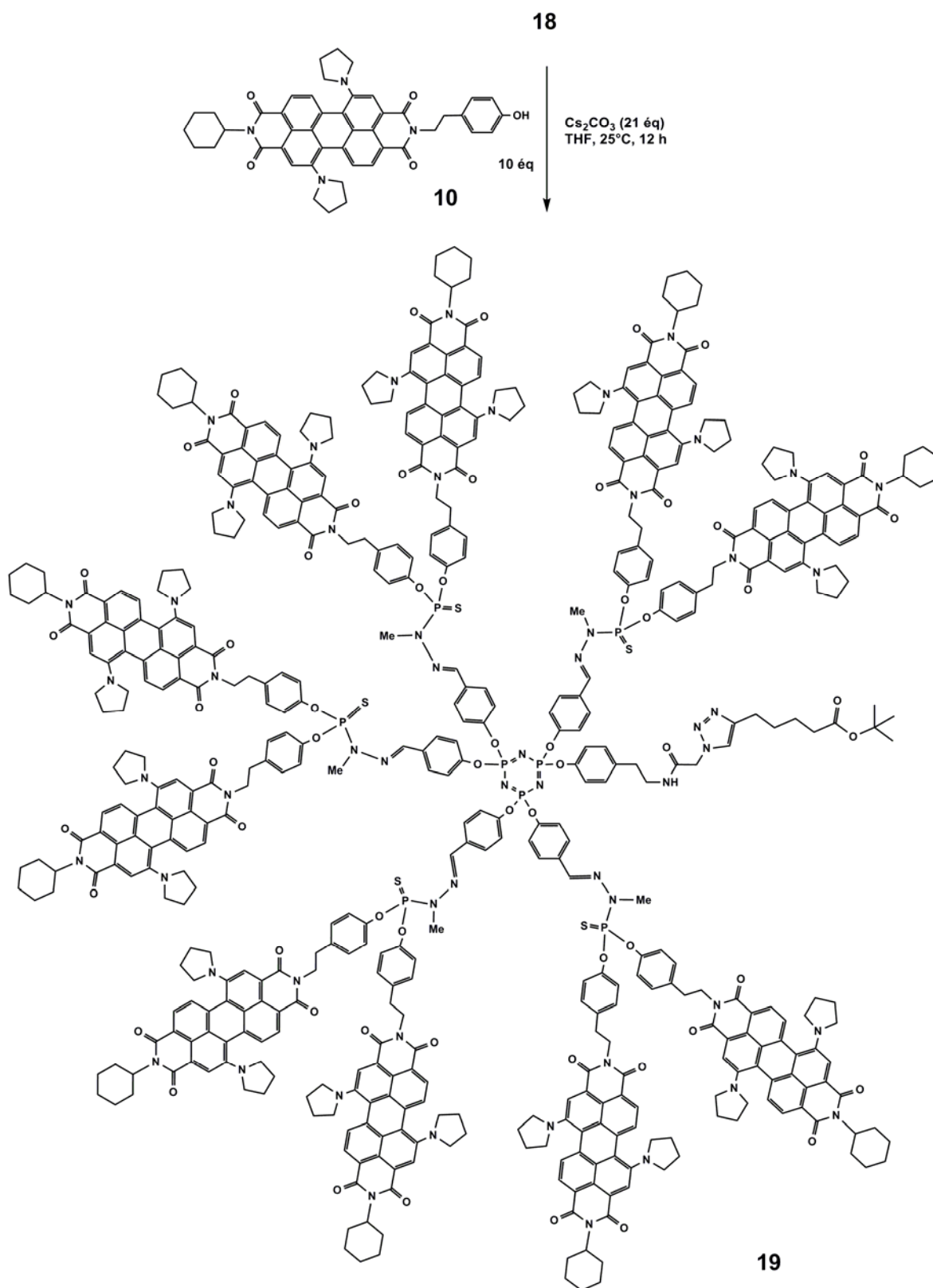


Figure 2-30 : Synthèse du dendri-pérylène AB₁₀ incorporant le bras-espaceur protégé

La déprotection de l'ester de *tert*-butyle pour libérer l'acide carboxylique correspondant se fait par l'action de l'acide trifluoroacétique (TFA en anglais) (cf. Figure 2-31). Cette méthode génère uniquement l'isobutène comme produit secondaire et l'acide en excès peut être éliminé par simple évaporation. Le mode opératoire consiste en la répétition des 3 étapes suivantes : i) solubilisation du dendrimère **19** dans un mélange de dichlorométhane/TFA (3/1, v/v), ii) agitation du mélange réactionnel à température ambiante pendant 1,5 heures, iii) évaporation complète du solvant sous vide. Ces 3 étapes ont été répétées 6 fois avant de donner le dendrimère **20** avec un rendement quantitatif.

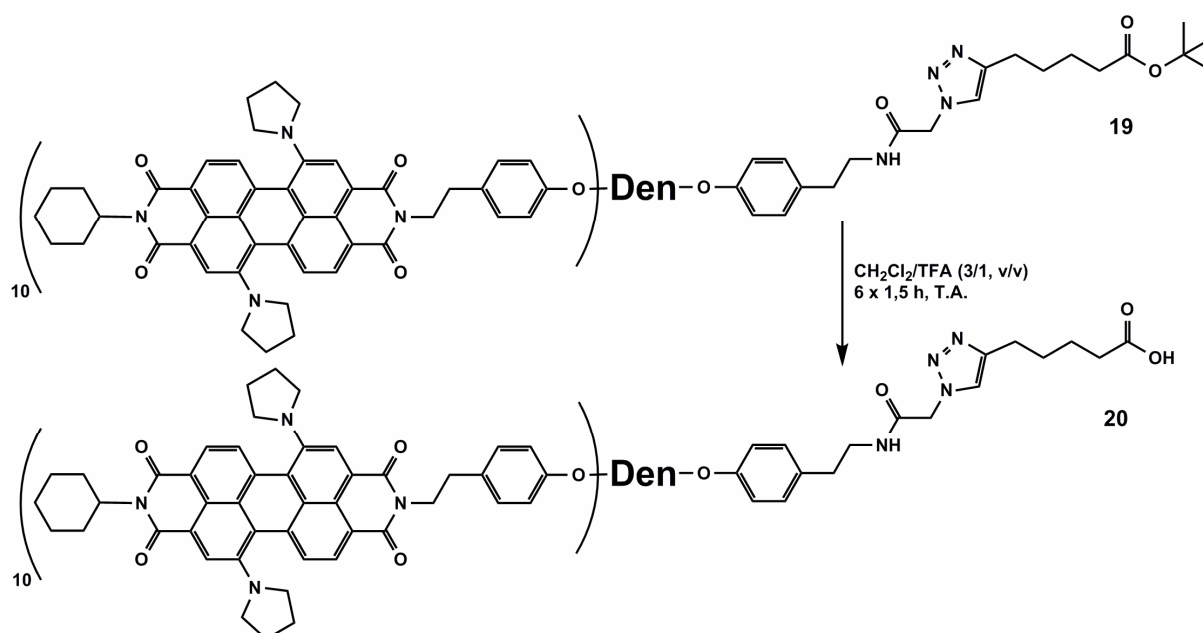


Figure 2-31 : Déprotection de l'ester *tert*-butyl par l'acide trifluoroacétique

La déprotection de l'ester de *tert*-butyle est indiquée par la disparition du signal correspondant aux protons méthyle du groupe *tert*-butyle à 1,45 ppm en RMN ^1H (CDCl_3). La totalité de cette déprotection est surtout confirmée par la disparition du signal correspondant aux carbones primaires du groupe *tert*-butyle à 28,10 ppm en RMN ^{13}C (CDCl_3).

2.5.4 Propriétés fluorescentes

Les propriétés spectroscopiques du monomère pérylène **10** et du dendrimère-pérylène AB_{10} -acide **20** ont d'abord été étudiées dans le chloroforme. Les spectres d'absorption et les spectres de fluorescence des deux composés sont représentés ci-dessous (cf. Figure 2-32).

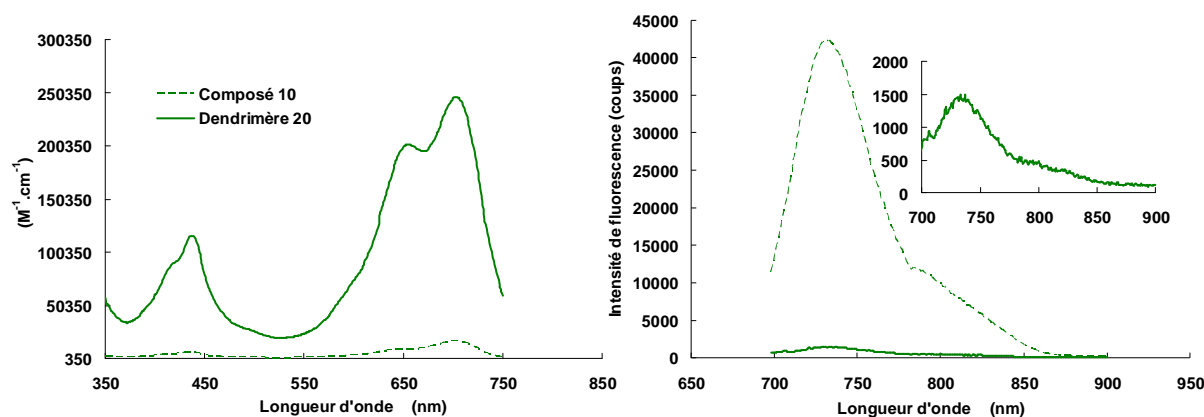


Figure 2-32 : Spectres d'absorption (gauche) et de fluorescence (droite) des composés 10 et 20 dans le chloroforme

Les spectres d'absorption des deux composés montrent la même allure et le dendrimère **20** ayant 10 motifs pérylène à la surface possède une capacité d'absorbance nettement plus élevée que le monomère **10**. Les spectres de fluorescence sont obtenus avec une excitation à 688 nm dans le chloroforme (cf. Figure 2-33). Les rendements quantiques sont calculés en utilisant le composé **8-1,7** comme référence. Le monomère **10** émet à 735 nm et a un rendement quantique de 23 %, ce qui est comparable au composé **8-1,7** et aux dérivés de pérylène décrits précédemment²⁶. Contrairement à notre attente, le dendrimère **20** n'est quasiment pas fluorescent ($\Phi_f < 1\%$). En effet, l'objectif était d'augmenter l'intensité de fluorescence de manière considérable en multipliant le nombre de chromophores par 10 sur le dendrimère. Néanmoins, cette augmentation de densité de fluorophores a un effet inverse sur la fluorescence globale du dendrimère.

Les dérivés pérylènes sont connus pour leur capacité à former des agrégats qui modifient leurs comportements optiques, notamment dans les solvants peu polaires^{37,38}. Les principaux types d'agrégats sont les deux suivants : i) agrégat de type H qui voit son maximum d'absorption déplacé vers le bleu par rapport au monomère et qui induit une perte de fluorescence de l'ensemble, ii) agrégat de type J qui voit ses maxima d'absorption et d'émission déplacés vers le rouge par rapport au monomère et qui n'affecte pas l'intensité de

³⁷ Fuller M. J., Sinks L. E., Rybtchinski B., Giaimo J. M., Li X. and Wasielewski M. R. *J. Phys. Chem. A.* **2005**, *109*, 970-975

³⁸ Würthner F., Thalacker C., Diele S. and Tschierske C. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 2245-2253

la fluorescence. Le cas du dendrimère **20** ne semble pas figurer parmi ces deux types d'agrégat, étant donné que le profil de son spectre d'absorbance n'a pas changé. Néanmoins, la quantité importante de motifs pérylène sur un dendrimère favorise l'interaction " -stacking" entre ces derniers, ce qui entraînerait une baisse considérable de la solubilité du dendrimère **20** sans pour autant faire des agrégats. En effet, l'agrandissement de la courbe de fluorescence du dendrimère **20** (cf. Figure 2-32 insert) montre des fluctuations importantes des valeurs mesurées malgré des temps d'acquisition prolongés, preuve de solubilité très médiocre dans le chloroforme. Ce problème de solubilité dû aux interactions " -stacking" entre les motifs pérylène est sans doute la cause de la perte de fluorescence du dendrimère **20**.

Les propriétés optiques du dendrimère **20** ont également été étudiées dans des mélanges de tétrahydrofurane (THF) et d'eau avec des pourcentages d'eau allant de 0 % à 30 % (%v) (cf. Figure 2-33) afin d'étudier les comportements de ce dendrimère en présence d'eau puisque son application serait dans les milieux aqueux.

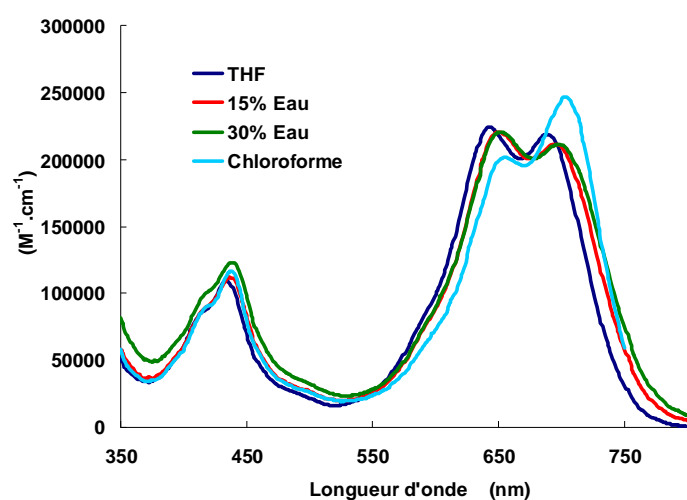


Figure 2-33 : Spectre d'absorbance du dendrimère pérylène avec bras-espaceur dans des mélanges de THF/eau

En comparant les spectres d'absorption du dendrimère **20** réalisés dans des mélanges contenant respectivement 0, 15 et 30 % d'eau, il n'est pas difficile de remarquer un léger effet bathochrome de l'eau (de l'ordre de 10 nm pour 30 % d'eau), c'est-à-dire que la présence de l'eau déplace les maxima d'absorption du dendrimère vers les longueurs d'ondes supérieures.

Un autre point que nous pouvons facilement remarquer est que le profil de la courbe d'absorption du dendrimère **20** dans le THF est différent de celui réalisé précédemment dans le chloroforme. Dans le chloroforme, le dendrimère **20** présente un maximum principal d'absorption à 705 nm et un maximum secondaire à 656 nm. Dans le THF, ces deux maxima deviennent comparables voire même inversés. Ce déplacement du maximum principal vers le bleu est caractéristique d'une agrégation de type H entre les motifs pérylène³⁷, particulièrement rapprochés par l'effet dendritique. Cette agrégation due aux interactions " -stacking" et favorisée par une densité importante de motifs pérylène par dendrimère provoque l'absence totale de fluorescence du dendrimère **20** dans le THF et ses mélanges avec l'eau (cf. Tableau 2-1), observée lors des mesures fluorimétriques.

Tableau 2-1 : Rendements quantiques du dendrimère 20 en fonction du pourcentage d'eau dans le mélange THF/eau

% en eau	0	5	10	15	20	30
Φ_f	0,005	0,003	0,002	0,002	0,002	0,001

Une solution qui pourrait éventuellement résoudre ce problème de " -stacking" serait de réduire le nombre de motifs pérylène à la surface du dendrimère par deux afin de les éloigner (cf. Figure 2-34). La monosubstitution des groupements dichlorothiophosphine peut être contrôlée à 95 % en effectuant une addition goutte à goutte à froid de 5 équivalents de monomère pérylène à une solution relativement diluée du dendrimère AB₁₀ en présence de seulement 5 équivalents de carbonate de césium. Une partie de disubstitution est inévitable puisqu'il semblerait que la substitution du deuxième atome de chlore commence avant la fin de la monosubstitution de tous les groupements thiophosphine. Ce dendrimère monosubstitué est isolé par chromatographie sur colonne à gel de silice et est caractérisé en RMN ³¹P (CDCl₃) par un signal à 8,5 ppm correspondant au cœur cyclotriphosphazène, un signal à 68,6 ppm correspondant aux groupements thiophosphine monosubstitués et un petit signal à 63,2 ppm correspondant à la disubstitution des groupements thiophosphine. Ce dendrimère, malgré son imperfection, permet de déterminer s'il y a une amélioration en diminuant le nombre de monomères pérylène à la surface du dendrimère. Le rendement quantique obtenu après les

mesures fluorimétriques dans le THF est de 1 %, ce qui rend l'amélioration loin d'être significative.

D'une manière générale, la nature du solvant joue un rôle important dans les propriétés optiques des chromophores, nous avons donc étudié l'absorption et la fluorescence du dendrimère **20** dans un solvant intercalant tel que le toluène et aucune amélioration a été observée.

Afin de vérifier si c'est la structure dendritique qui interagit avec les pérylènes pour désactiver la fluorescence, nous avons préparé des solutions dans le THF contenant à la fois le dendrimère de 1^{ère} génération classique (non fluorescent) et le monomère pérylène **10** dans des proportions différentes : dendrimère/monomère pérylène = 1/1, 1/2, 1/5, 1/10 et monomère pérylène seul. Dans tous les cas, la fluorescence n'est pas affectée, nous pouvons alors conclure que ce n'est pas la simple présence du dendrimère qui cause la perte de fluorescence. Nous pouvons donc penser que le dendrimère pérylène **20** adopterait une configuration particulière et complexe due à de nombreuses interactions aromatiques et à l'effet dendritique qui restent à étudier.

Néanmoins, cette perte de fluorescence du dendrimère **20** ne nous empêche pas de réaliser son greffage à des protéines, à savoir l'albumine de sérum bovin (ASB) et l'anticorps anti-trp75 qui est un anticorps monoclonal contre la TRP (Tyrosinase Related-Protein) impliquée dans le développement du mélanome, et ce pour plusieurs raisons : i) la fluorescence du dendrimère **20** n'étant pas nulle, une fois conjugué à la protéine, nous pouvons espérer les observer avec la microscopie à fluorescence qui est un appareil extrêmement sensible, ii) le couplage du dendrimère à la protéine changerait la configuration et l'environnement global de ce dernier, ce qui pourrait modifier les propriétés optiques, iii) le couplage réussi du dendrimère **20** à la protéine permettrait de valider une étape importante du projet même si l'ensemble n'est pas fluorescent.

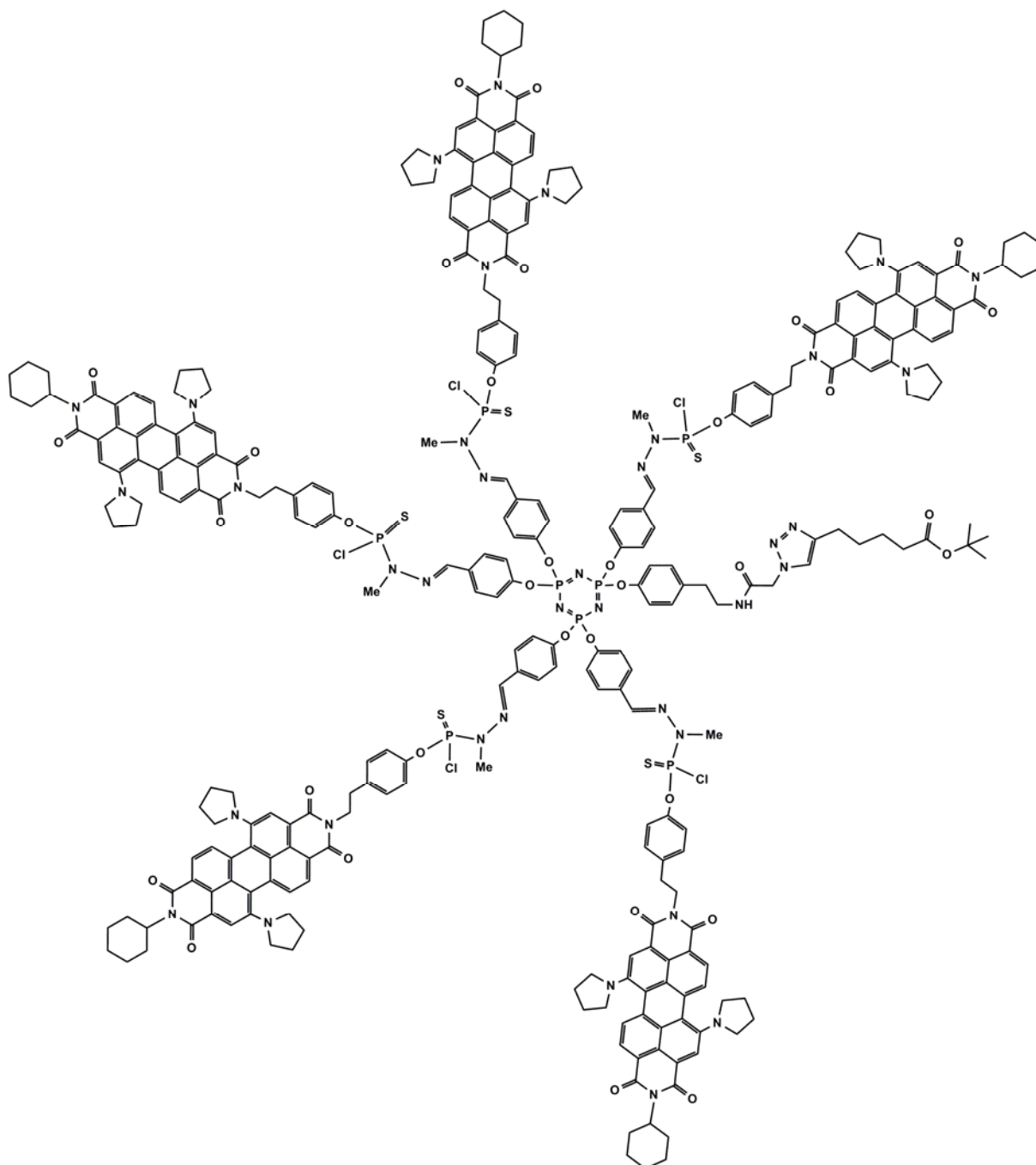


Figure 2-34 : Dendrimère avec groupements thiophosphine monosubstitués par des motifs pérylène

2.5.5 Couplage du dendri-pérylène incorporant un bras à une protéine

Pour être couplé à une protéine, le dendrimère **20** ayant un acide carboxylique ne peut pas s'utiliser tel quel, une activation de la fonction carboxylique par l'ester de N-hydroxysuccinimide est nécessaire. La méthode employée est différente de celle utilisée dans le cas de l'activation de la rhodamine B (cf. Partie 2.4.1). En effet, la quantité de produit

manipulée étant très petite (de l'ordre de 10 mg), il est préférable d'effectuer l'activation sans générer des produits secondaires difficilement séparables. Pour ce faire, seul le diisopropylcarbodiimide (DIPC) est utilisé comme agent de couplage pour réaliser l'estérification entre l'acide du dendrimère et le N-hydroxysuccinimide (cf. Figure 2-35). L'activation génère uniquement l'urée correspondant et le DIPC en excès peut être éliminé par évaporation sous vide.

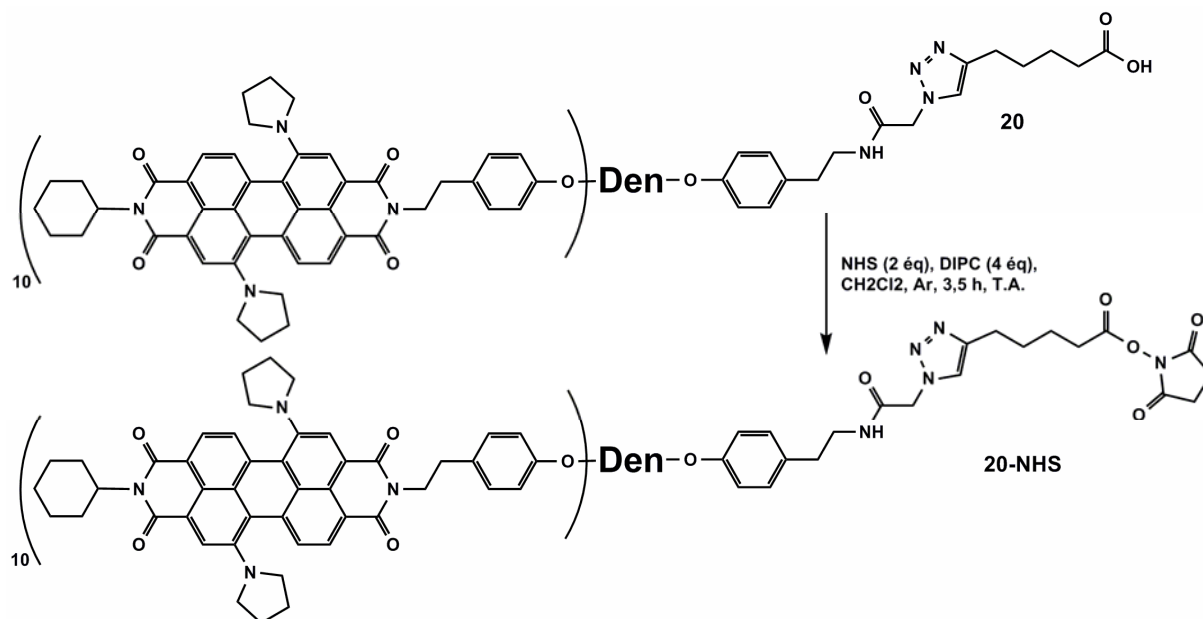


Figure 2-35 : Activation de l'acide carboxylique du dendrimère **20** par l'ester de N-hydroxysuccinimide

Le couplage d'une entité biologique à une sonde fait souvent intervenir un mélange de deux solvants : un solvant aqueux tampon pour solubiliser l'entité biologique et un minimum de solvant organique miscible à l'eau, par exemple le diméthylformamide (DMF) dans la majorité des cas, pour solubiliser la sonde tout en évitant la dénaturation de l'entité biologique. Dans le cas présent, l'ASB ou l'anticorps anti-trp75 est solubilisé dans le tampon phosphate à pH 7,4 tandis que le dendrimère **20** activé est solubilisé dans un mélange de DMF/dioxane anhydre car il n'est pas soluble dans le DMF seul. Ces solutions sont préparées de telle sorte qu'une fois mélangées, le rapport ASB ou Anticorps/dendrimer soit égal à 0,1. Les solutions mélangées sont immédiatement soumises à une forte agitation afin d'amorcer la réaction puis laissées sous agitation moins importante pendant 2 heures à température ambiante pour que le couplage soit total.

Les poids moléculaires de l'ASB et l'anticorps anti-trp75 sont supérieurs à 50 kDa, tandis que le dendrimère **20** a une masse molaire de 8843 g/mol, les molécules de dendrimères n'ayant pas réagi peuvent donc être éliminées par filtration sur une membrane avec un seuil de coupure de 50kDa. La partie retenue contenant la protéine seule et couplée est reprise dans le tampon phosphate à pH 7,4. Le taux de greffage ne peut pas être déterminé mais la couleur verte de la solution obtenue indique la réussite de ce greffage.

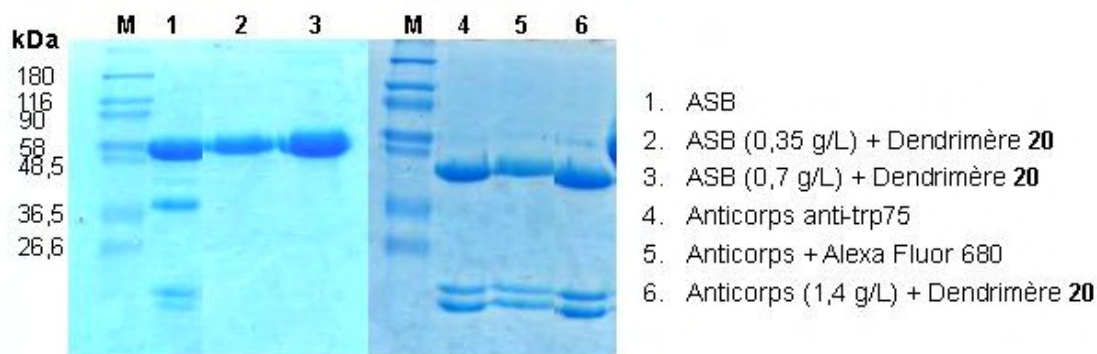


Figure 2-36 : Gel d'électrophorèse des différents échantillons de couplage à la protéine

Les échantillons obtenus sont ensuite déposés sur un gel d'électrophorèse pour être analysés (cf. Figure 2-36). Les bandes correspondant à l'ASB ou à l'anticorps anti-trp75 sont bien visibles et identifiables grâce à la coloration au Bleu de Coomassie qui révèle les bandes protéiques. Néanmoins aucune fluorescence n'est détectée au microscope à fluorescence pour les bandes correspondantes, seul l'anticorps couplé à l'Alexa Fluor 680, utilisé comme contrôle positif, est observé.

2.6 Conclusion

L'objectif de cette étude consistait à synthétiser un dendrimère fluorescent capable de cibler les cellules cancéreuses pour l'imagerie *in vivo* non invasive des événements cellulaires et moléculaires chez l'animal vivant porteur de cancer. Trois types de dendrimère contenant respectivement la phthalocyanine, des motifs rhodamine et des motifs pérylène ont été synthétisés et étudiés dans ce but.

Le dendrimère polycationique à cœur phthalocyanine, comme son nom l'indique, ne possède qu'un seul fluorophore, ce qui n'est pas suffisant pour sa détection *in vivo* par la

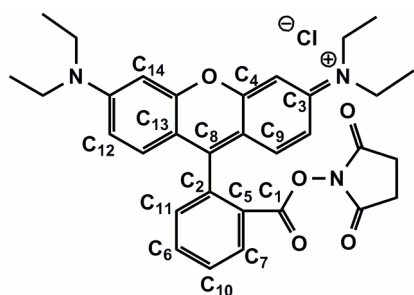
microscopie à fluorescence. De plus, ce dendrimère induit la production d'espèces réactives oxygénées par des cellules étudiées et ainsi une cytotoxicité importante.

Le dendrimère-RB a pu être obtenu après ajout du point d'ancrage, la tyramine, sur la rhodamine B. Il possède 12 motifs rhodamine B en 1^{ère} génération grâce à la multiplicité de ses fonctions de surface. Malheureusement, à cause de la cyclisation intramoléculaire en milieux neutre et basique de la rhodamineB-tyramine, le dendrimère-RB obtenu n'est que très peu fluorescent et sa fluorescence induite par l'ajout de l'acide semble être éphémère.

Le dendrimère-pérylène incorporant un bras-espaceur est un modèle complet pour réaliser le ciblage et l'imagerie des cellules cancéreuses *in vivo* par la fluorescence. La synthèse de ce dendrimère possédant 10 motifs pérylène incorporant un bras-espaceur et l'étude préliminaire de son couplage à l'ASB et l'anticorps anti-trp75 ont permis, malgré la perte de fluorescence due aux interactions "π-stacking", de valider le concept de l'outil fluorescent "intelligent" à base de dendrimère phosphoré pour l'imagerie *in vivo*.

2.7 Partie expérimentale

Composé 1 : RB-NHS



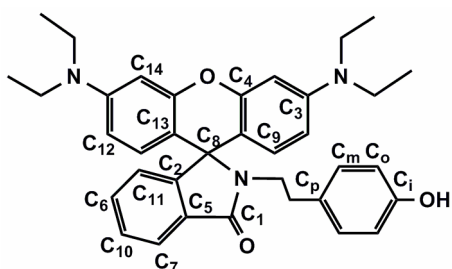
A une solution de rhodamine B (2,4 g, 5 mmol) et de N-hydroxysuccinimide (0,6 g, 5,2 mmol) dans l'acétonitrile distillé (100 mL) à 45°C, a été ajoutée goutte à goutte une solution de dicyclohexylcarbodiimide (1,2 g, 5,8 mmol) dans l'acétonitrile distillé (50 mL). Le mélange réactionnel est laissé agiter à 45°C et sous Ar pendant 1 heure puis à température ambiante pendant 20 heures. Le mélange réactionnel a été filtré pour éliminer les précipités et

évaporer à sec puis séché sous vide. Le produit brut a été purifié par recristallisation par refroidissement dans l'éthanol absolu pour donner le composé **1** sous forme de solide (29 %).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz): = 1,35 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,6$ Hz, 12H, N-CH $_2$ -CH $_3$), 2,79 (s, 4H, CO-CH $_2$), 3,66 (q, $^3J_{\text{HH}} = 6,6$ Hz, 8H, N-CH $_2$ -CH $_3$), 6,9 (sl, 4H, C $_9$ -H, C $_{14}$ -H), 7,10 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9,6$ Hz, 2H, C $_{12}$ -H), 7,50 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$ Hz, 1H, C $_{11}$ -H), 7,84 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,5$ Hz, 1H, C $_{10}$ -H), 8,00 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$ Hz, 1H, C $_6$ -H), 8,44 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz, 1H, C $_7$ -H) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz): = 12,73 (s, N-CH $_2$ -CH $_3$), 25,62 (s, CO-CH $_2$), 46,29 (s, N-CH $_2$ -CH $_3$), 96,77 (s, C $_{14}$), 113,46 (s, C $_{13}$), 114,47 (s, C $_{12}$), 130,68 (s, C $_{11}$), 130,95 (s, C $_9$), 131,13 (s, C $_{10}$), 131,79 (s, C $_7$, C $_8$), 134,54 (s, C $_5$), 134,94 (s, C $_6$), 155,66 (s, C $_4$), 157,83 (s, C $_2$, C $_3$), 160,74 (s, C $_1$), 168,64 (s, CO-CH $_2$) ppm.

Composé **2c** : RB-Tyr cyclisée



A une solution de composé **1** (800 mg, 1,4 mmol) dans l'acétonitrile distillé (40 mL) a été ajoutée une solution de tyramine (210 mg, 1,5 mmol) dans le tampon borate à pH 8,5 (40 mL) et le mélange réactionnel est laissé agiter pendant 36 heures à température ambiante. Après évaporation totale de l'acétonitrile, les précipités ont été récupérés par filtration. Le produit brut a été purifié par recristallisation par refroidissement dans l'éthanol contenant 1 % (%v) d'eau, suivie de la chromatographie sur colonne à gel de silice en utilisant dichlorométhane/Méthanol (dichlorométhane pur \rightarrow 90/10, v/v) pour donner le composé **2c** sous forme de poudre blanche (20 %).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) : = 1,18 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$ Hz, 12H, N-CH $_2$ -CH $_3$), 2,39 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 2H, C $_6\text{H}_4$ -CH $_2$ -CH $_2$ -N), 3,28 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 2H, C $_6\text{H}_4$ -CH $_2$ -CH $_2$ -N), 3,35 (q, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$ Hz, 8H, N-CH $_2$ -CH $_3$), 5,85 (s, 1H, OH), 6,27 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9,0$ Hz, 2H, C $_9$ -H), 6,43 (s,

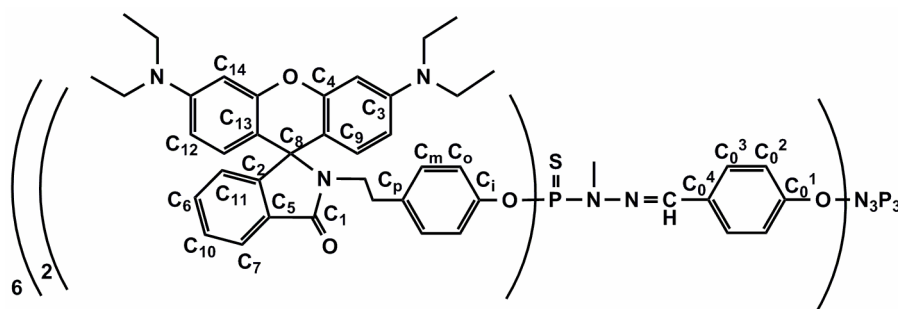
2H, C₁₄), 6,44 (d, ³J_{HH} = 11,0 Hz, 2H, C₁₂-H), 6,71 (d, ³J_{HH} = 8,4 Hz, 2H, C_o-H), 6,84 (d, ³J_{HH} = 8,4 Hz, 2H, C_m-H), 7,14 (m, 1H, C₁₁-H), 7,46 (m, 2H, C₆-H, C₁₀-H), 7,94 (m, 1H, C₇-H) ppm.

RMN ¹³C{¹H} (CDCl₃, 75,5 MHz): = 12,59 (s, N-CH₂-CH₃), 33,73 (s, C₆H₄-CH₂-CH₂-N), 42,37 (s, C₆H₄-CH₂-CH₂-N), 44,37 (s, N-CH₂-CH₃), 65,13 (s, C₈), 97,72 (s, C₁₄), 105,71 (s, C₁₃), 108,14 (s, C₁₂), 115,15 (s, C_o), 122,78 (s, C₇), 123,80 (s, C₁₁), 128,07 (s, C₁₀), 129,00 (s, C₉), 129,81 (s, C_m), 131,31 (s, C₅), 131,63 (s, C_p), 132,32 (s, C₆), 148,81 (s, C₃), 153,29 (s, C₂), 153,47 (s, C₄), 154,27 (s, C_i), 167,80 (s, CO-N) ppm.

SM-ESI : 562,7 [M+H]⁺, 584,7 [M+Na]⁺.

Analyse élémentaire: calculé pour C₃₆H₃₉N₃O₃ (561,7) : C, 76,84 ; H, 7,16 ; N, 7,47 ; trouvé : C, 75,79 ; H, 7,47 ; N, 7,23.

Composé 3: Dendrimère rhodamine non fluorescent



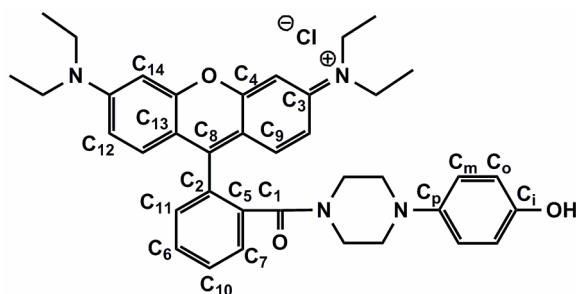
A une solution de composé **2c** (100 mg, 0,18 mmol) et de dendrimère de première génération (26,6 mg, 14,5 μmol) dans le THF distillé (5 mL), a été ajouté le carbonate de césium (114 mg, 0,351 mmol) et le mélange réactionnel est laissé agiter à 50°C pendant 12 heures. Le sel formé a été filtré et la solution a été évaporée à sec. Le produit brut a été solubilisé dans un minimum de dichlorométhane et précipité dans un mélange de pentane/éther diéthylique refroidi à l'aide d'un bain de glace. Cette opération a été répétée une fois et le composé **3** est obtenu sous forme de poudre blanche (91 %).

RMN ³¹P{¹H} (THF-*d*8, 121,5 MHz) : = 8,53 (s, N₃P₃), 62,69 (s, P=S) ppm.

RMN ^1H (THF-*d*8, 300 MHz) : = 1,11 (m, 144H, N-CH₂-CH₃), 2,43 (sl, 24H, C₆H₄-CH₂-CH₂-N), 3,18 (sl, 42H, C₆H₄-CH₂-CH₂-N, N-CH₃), 3,32 (m, 96H, N-CH₂-CH₃), 6,28 (m, 24H, C₉-H), 6,33 – 6,50 (m, 48H, C₁₂-H, C₁₄-H), 6,70 – 7,15 (m, 60H, C_o-H, C_m-H, C_o²-H, C_o³-H), 7,41 (m, 24H, C₆-H, C₁₀-H), 7,60 – 7,75 (m, 18H, C_o³-H, CH=N), 7,81 (sl, 12H, C₇-H) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (THF-*d*8, 75,5 MHz) : = 12,01 (s, N-CH₂-CH₃), 32,80 (sl, N-CH₃), 33,92 (s, C₆H₄-CH₂-CH₂-N), 41,84 (s, C₆H₄-CH₂-CH₂-N), 44,04 (s, N-CH₂-CH₃), 64,34 (s, C₈), 78,48 (s), 97,59 (s, C₁₄), 106,16 (s, C₁₃), 107,96 (s, C₁₂), 121,02 (2s, C_o, C_o²), 122,20 (s, C₇), 123,64 (s, C₁₁), 127,63 (s, C₁₀), 128,67 (s, C_m, C_o³), 129,34 (s, C₉), 131,68 (s, C_p, C_o⁴), 131,88 (s, C₅, C₆), 136,56 (s, CH=N), 148,64 (s, C_o¹), 148,99 (s, C₃), 153,45 (s, C_i, C₂, C₄), 166,50 (s, CO-N) ppm.

Composé 4 : RB-piperazine



A une suspension de 4-hydroxyphénylpiperazine (30,3 mg, 0,17 mmol) dans le tampon borate pH 8,5 (5 mL), a été ajoutée une solution de composé **2** (100 mg, 0,17 mmol) dans l'acétonitrile distillé (5 mL) et le mélange réactionnel est laissé agiter pendant 12 heures à température ambiante. Après évaporation des solvants, le brut réactionnel est repris dans le chloroforme et filtré. La solution est évaporée à sec et le produit brut a été purifié par recristallisation par refroidissement (x 2) dans l'éthanol absolu pour donner le composé **4** sous forme d'un solide (11 %).

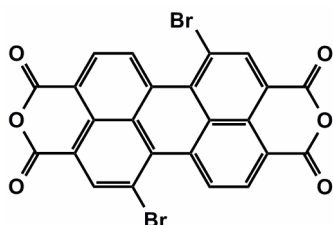
RMN ^1H (CD₃OD, 300 MHz) : = 1,29 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$ Hz, 12H, N-CH₂-CH₃), 2,45 – 2,80 (m, 4H, C₆H₄-N-CH₂-CH₂), 3,54 (t, $^3J_{\text{HH}} = 4,5$ Hz, 4H, C₆H₄-N-CH₂-CH₂), 3,68 (q, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$ Hz, 8H, N-CH₂-CH₃), 6,68 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9$ Hz, 2H, C_o-H), 6,74 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9$ Hz, 2H, C_m-H),

6,98 (2s, 2H, C₁₄-H), 7,08 (2d, ³J_{HH} = 9,6 Hz, 2H, C₉-H), 7,33 (d, ³J_{HH} = 9,6 Hz, 2H, C₁₂-H), 7,57 (m, 1H, C₁₁-H), 7,72 (m, 1H, C₇-H), 7,79 (m, 2H, C₆-H, C₁₀-H) ppm.

RMN ¹³C{¹H} (CD₃OD, 75,5 MHz) : = 11,43 (s, N-CH₂-CH₃), 41,68 et 45,25 (2s, C₆H₄-N-CH₂-CH₂), 45,49 (s, N-CH₂-CH₃), 50,97 et 51,40 (2s, C₆H₄-N-CH₂-CH₂), 95,93 (s, C₁₄), 113,49 (s, C₁₃), 114,04 (s, C₁₂), 115,25 (s, C_o), 119,10 (s, C_m), 127,54 (s, C₁₁), 130,64 (s, C₈), 131,99 (s, C₅, C₇, C₁₀), 135,46 (s, C₆), 144,10 (s, C_i), 152,12 (s, C_p), 155,62 (s, C₄), 155,80 (s, C₃), 157,88 (s, C₂), 167,87 (s, C₁) ppm.

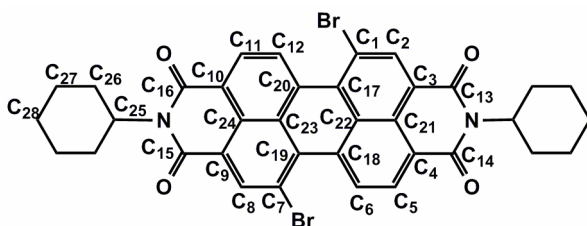
SM-ESI : 603,3 [M]⁺

Composé 6 : Pérylène dibromé



A une solution de **5**, Pérylène dianhydride (3,2 g, 8,16 mmol) dans l'acide sulfurique (96 %, 45 mL), a été ajouté l'iode (77 mg, 0,3 mmol). Le mélange réactionnel est laissé agiter pendant 2h à 25°C. Le mélange réactionnel a été ensuite chauffé à 80°C, le brome (0,92 mL, 18 mmol) a été ajouté goutte à goutte. Le mélange est laissé agiter à 80°C pendant 16 h puis refroidi à la température ambiante, l'excès de brome a été enlevé par un flux d'argon. Le produit brut a été précipité dans une grande quantité d'eau glacée. Le précipité a été séparé par filtration et lavé avec l'eau distillée jusqu'à ce que la phase aqueuse en sortie soit neutre. Le produit précipité est ensuite lavé avec le méthanol puis l'éther diétylique et séché sous vide pour donner le produit brut **6** sous forme de poudre rouge sans purification supplémentaire.

Composé 7 : Pérylène dibromé diimide

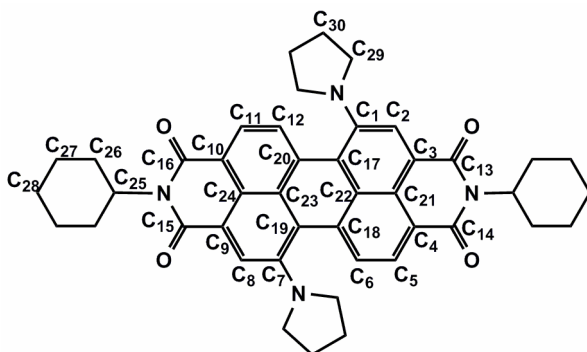


Le produit brut **6** (3,34 mg, 6,05 mmol), la cyclohexylamine (2,07 mL, 18,15 mmol) et l'acide acétique (1,67 mL, 29,3 mmol) ont été mélangés et chauffés à 85°C dans 70 mL de NMP (N-méthylpyrrolidinone) pendant 2 h. Le mélange réactionnel a été refroidi à température ambiante. Le produit brut a été collecté par filtration et lavé avec le méthanol. Le produit obtenu a été purifié par chromatographie sur colonne à gel de silice en utilisant hexane/dichlorométhane (8/2 → 4/6, v/v) comme éluant pour donner un mélange de deux isomères diimide sous forme de solide rouge orangé. Ces deux isomères ne peuvent pas être séparés par chromatographie sur colonne. Ils ont été identifiés en RMN ^1H . D'après le spectre ^1H , le produit d'intérêt (dibromé en position 1,7) représente 94 % dans le mélange.

RMN ^1H (CDCl_3 , 500,3 MHz): δ = 1,33 – 1,43 (m, 2H, $\text{C}_{28}\text{-H}_{\text{ax}}$), 1,45 – 1,55 (m, 4H, $\text{C}_{27}\text{-H}_{\text{ax}}$), 1,73 – 1,83 (m, 6H, $\text{C}_{28}\text{-H}_{\text{eq}}$, $\text{C}_{26}\text{-H}_{\text{ax}}$), 1,91 – 1,98 (m, 4H, $\text{C}_{27}\text{-H}_{\text{eq}}$), 2,47 – 2,70 (m, 4H, $\text{C}_{26}\text{-H}_{\text{eq}}$), 4,96 – 5,12 (m, 2H, CH-N), 8,7 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,1$ Hz, 2H, $\text{C}_5\text{-H}$, $\text{C}_{11}\text{-H}$), 8,91 (s, 2H, $\text{C}_2\text{-H}$, $\text{C}_8\text{-H}$), 9,51 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,1$ Hz, 2H, $\text{C}_6\text{-H}$, $\text{C}_{12}\text{-H}$) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 125,8 MHz): δ = 25,38 (s, C_{28}), 26,50 (s, C_{27}), 29,10 (s, C_{26}), 54,26 (s, C_{25}), 120,71 (s, C_1 , C_7), 123,32 (s, C_3 , C_9), 123,72 (s, C_{22} , C_{23}), 127,04 (s, C_{21} , C_{24}), 128,47 (s, C_6 , C_{12}), 129,25 (s, C_{18} , C_{20}), 129,98 (s, C_5 , C_{11}), 132,68 (s, C_4 , C_{10}), 132,84 (s, C_{17} , C_{19}), 137,96 (s, C_2 , C_8), 162,79 (s, C_{13} , C_{15}), 163,34 (s, C_{14} , C_{16}) ppm.

Composé 8 : Pérylène dipyrrolidine diimide



Le mélange de ces précédents isomères diimide **7-1,7** et **7-1,6** (1,6 g, 2,25 mmol) a été agité dans la pyrrolidine (80 mL, 958 mmol) à 55°C sous Ar pendant 24 h. Le mélange réactionnel a été ensuite refroidi à température ambiante et introduit dans 250 mL d'acide chlorhydrique à 10 % sous agitation. Après extraction au dichlorométhane, la phase organique a été séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée. Le produit obtenu a été purifié par filtration sur gel de silice en utilisant l'acétone comme éluant suivie de filtration sur alumine neutre en utilisant le chloroforme comme éluant pour donner un mélange de deux isomères pyrrolidinyl diimides **8-1,7** et **8-1,6** sous forme de solide vert foncé.

Une petite quantité (20 mg) de ces isomères a été séparée par chromatographie chirale (ChiralCel OD) en utilisant éther de pétrole/éthanol (8/2, v/v).

Diimide 8-1,7

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): = 1,31 – 1,55 (m, 6H, $\text{C}_{28}\text{-H}_{\text{ax}}$, $\text{C}_{27}\text{-H}_{\text{ax}}$), 1,65 – 1,85 (m, 6H, $\text{C}_{28}\text{-H}_{\text{eq}}$, $\text{C}_{26}\text{-H}_{\text{ax}}$), 1,85 – 2,15 (m, 12H, $\text{C}_{27}\text{-H}_{\text{eq}}$, $\underline{\text{CH}_2}\text{-CHH}'\text{-N}$), 2,50 – 2,70 (m, 4H, $\text{C}_{26}\text{-H}_{\text{eq}}$), 2,70 – 3,05 (sl, 4H, $\text{CHH}'\text{-N}$), 3,50 – 4,0 (sl, 4H, $\text{CHH}'\text{-N}$), 4,96 – 5,15 (m, 2H, CH-N), 7,75 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,1$ Hz, 2H, $\text{C}_6\text{-H}$, $\text{C}_{12}\text{-H}$), 8,42 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,1$ Hz, 2H, $\text{C}_5\text{-H}$, $\text{C}_{11}\text{-H}$), 8,49 (s, 2H, $\text{C}_2\text{-H}$, $\text{C}_8\text{-H}$) ppm.

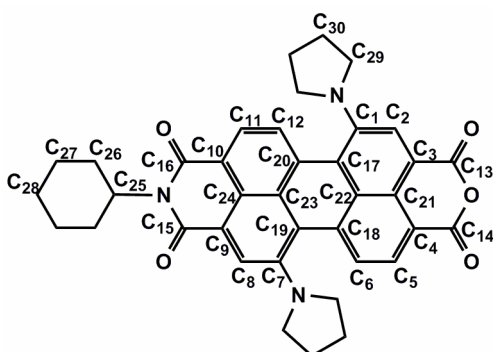
RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz): = 25,55 (s, C_{28}), 25,82 (s, $\underline{\text{CH}_2}\text{-CHH}'\text{-N}$), 26,63 (s, C_{27}), 29,18 (s, C_{26}), 52,16 (s, C_{29}), 53,73 (s, C_{25}), 118,15, 119,65 (2s, C_{19} , C_{17} , C_{22} , C_{23}), 120,74 (s, C_2 , C_8), 122,36 (s, C_9 , C_3 , C_{21} , C_{24}), 123,89 (s, C_6 , C_{12}), 126,68 (s, C_5 , C_{11}), 130,02,

134,22 (2s, C₁₀, C₄, C₁₈, C₂₀), 146,57 (s, C₁, C₇), 164,59 (s, C₁₄, C₁₆), 164,67 (s, C₁₃, C₁₅) ppm.

UV/Vis (CHCl₃) : max (nm) [(M⁻¹cm⁻¹)] = 700 [26724], 646 [14143], 437 [10317].

Fluorescence (CHCl₃) : max = 735 nm, rendement quantique $\Phi_f = 0,25$.

Composé 9 : Pérylène pyrrolidine monoimide

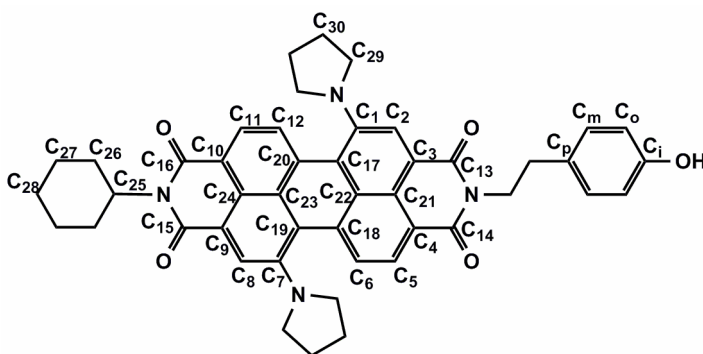


Le composé **8** (1,57 g, 2,27 mmol) et l'hydroxyde de potassium (6,36 g, 113,6 mmol) sont solubilisés dans un mélange d'eau distillée et d'isopropanol (16 mL/94 mL) et le mélange a été chauffé à reflux. Le mélange réactionnel est laissé agiter pendant 2,75 h et introduit dans 300 mL d'acide acétique sous agitation. Après extraction au dichlorométhane, les phases organiques ont été lavées à l'eau distillée puis par une solution saturée en NaHCO₃, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et évaporées. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne à gel de silice en utilisant acétone/hexane (15/85, v/v) pour donner le composé **9** sous forme de poudre verte.

RMN ¹H (CDCl₃, 300,1 MHz): = 1,31 – 1,55 (m, 3H, C₂₈-H_{ax}, C₂₇-H_{ax}), 1,65 – 1,85 (m, 3H, C₂₈-H_{eq}, C₂₆-H_{ax}), 1,85 – 2,15 (m, 10H, C₂₇-H_{eq}, CH₂-CHH'-N), 2,50 – 2,70 (m, 2H, C₂₆-H_{eq}), 2,70 – 3,05 (sl, 4H, CHH'-N), 3,55 – 3,95 (sl, 4H, CHH'-N), 4,96 – 5,15 (m, 1H, CH-N), 7,59 (d, ³J_{HH} = 8,1 Hz, 1H, C₆-H), 7,76 (d, ³J_{HH} = 8,1 Hz, 1H, C₁₂-H), 8,42 (d, ³J_{HH} = 8,1 Hz, 1H, C₅-H), 8,44 (d, ³J_{HH} = 8,1 Hz, 1H, C₁₁-H), 8,47 (s, 1H, C₈-H), 8,51 (s, 1H, C₂-H,) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz): = 25,52 (s, C_{28}), 25,82 (s, $\underline{\text{CH}_2\text{-CHH' -N}}$), 26,61 (s, C_{27}), 29,18 (s, C_{26}), 52,33, 52,49 (2s, C_{29}), 53,87 (s, C_{25}), 117,28 (s, C_{19} , C_{17}), 120,49 (s, C_{22} , C_{23}), 120,91 (s, C_2), 122,18 (s, C_3 , C_9), 122,41 (s, C_8), 123,18 (s, C_{21} , C_{24}), 123,70 (s, C_6), 124,46 (s, C_{12}), 126,47 (s, C_{11}), 128,84 (s, C_5), 130,36 (s, C_4 , C_{10}), 136,04 (s, C_{18} , C_{20}), 146,27 (s, C_1), 147,20 (s, C_7), 160,88 (s, C_{13} , C_{14}), 164,47 (s, C_{15} , C_{16}) ppm.

Composé 10 : Pérylène tyramine



Un mélange de composé **9** (480 mg, 0,785 mmol), tyramine (324 mg, 2,35 mmol), imidazole (8,016 g, 117 mmol) et acétate de zinc (98 mg, 0,447 mmol) a été chauffé à 140°C pendant 4 h sous Ar. Le mélange réactionnel a été refroidi à température ambiante, 100 mL d'acide chlorhydrique 1N ont été ajoutés avant sonication jusqu'à solubilisation du solide. Après extraction au chloroforme, la phase organique a été séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et concentré à l'évaporateur rotatif. Le produit brut obtenu a été ensuite purifié par chromatographie sur colonne à gel de silice en utilisant dichlorométhane/acétate d'éthyle (9/1, v/v) comme éluant pour donner le pérylène-tyramine **10** sous forme d'un solide vert foncé (92,3 %).

^1H NMR (CDCl_3 , 500,3 MHz): = 1,40 (m, 1H, $\text{C}_{28}\text{-H}_{\text{ax}}$), 1,53 (m, 2H, $\text{C}_{27}\text{-H}_{\text{ax}}$), 1,70 – 2,15 (m, 13H, $\text{C}_{28}\text{-H}_{\text{eq}}$, $\text{C}_{26}\text{-H}_{\text{ax}}$, $\text{C}_{27}\text{-H}_{\text{eq}}$, $\underline{\text{CH}_2\text{-CHH' -N}}$), 2,50 – 2,90 (m, 6H, $\text{C}_{26}\text{-H}_{\text{eq}}$, $\underline{\text{CHH' -N}}$), 3,00 (m, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 3,65 (sl, 4H, $\underline{\text{CHH' -N}}$), 4,42 (m, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 5,13 (tt, $^3J_{\text{HH}} = 12,5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5$ Hz, 1H, CH-N), 6,95 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 2H, $\text{C}_o\text{-H}$), 7,28 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 2H, $\text{C}_m\text{-H}$), 7,33 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 1H, $\text{C}_6\text{-H}$), 7,52 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 1H, $\text{C}_{12}\text{-H}$), 8,19 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 1H, $\text{C}_5\text{-H}$), 8,30 (s, 1H, $\text{C}_2\text{-H}$), 8,34 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8$ Hz, 1H, $\text{C}_{11}\text{-H}$), 8,37 (s, 1H, $\text{C}_8\text{-H}$) ppm.

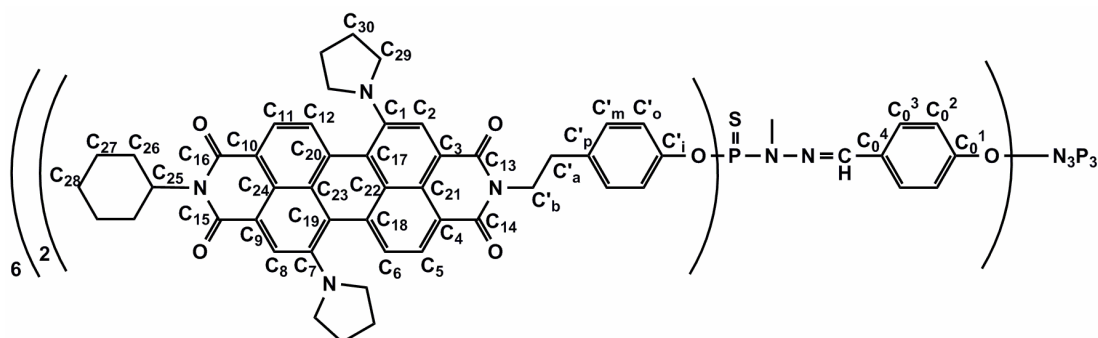
RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 125,8 MHz): = 25,58 (s, C_{28}), 25,77 (s, $\underline{\text{CH}_2\text{-CHH'}}$ -N), 26,67 (s, C_{27}), 29,20 (s, C_{26}), 33,54 (s, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 42,26 (s, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 52,10 (s, $\text{CH}_2\text{-CHH'}$ -N), 53,89 (s, C_{25}), 115,59 (s, C_0), 117,59, 118,16, 118,41, 119,57 (4s, C_{17} , C_{22} , C_{19} , C_{23}), 120,67 (s, C_2), 120,77 (s, C_8), 121,05 (s, C_3), 121,87 (s, C_{21}), 122,04 (s, C_{24}), 122,30 (s, C_9), 123,49 (s, C_6), 123,76 (s, C_{12}), 126,50 (s, C_{11}), 126,73 (s, C_5), 129,57, 129,68, (2s, C_{10} , C_4), 130,18 (s, C_m), 130,54 (s, C_p), 133,77, 134,13 (2s, C_{20} , C_{18}), 146,27 (s, C_1), 146,51 (s, C_7), 154,98 (s, C_i), 163,94 (s, C_{14}), 164,03 (s, C_{13}), 164,58 (s, C_{15} , C_{16}) ppm.

SM-IE : 730,5 $[\text{M}]^+$.

UV/Vis (CHCl_3) : max (nm) [$(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$] = 702 [17095], 648 [9281], 435 [6883].

Fluorescence (CHCl_3) : max = 735 nm, rendement quantique $\Phi_f = 0,23$.

Composé 11 :



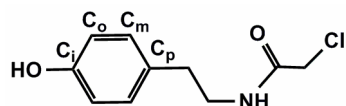
A une solution de dendrimère de 1^{ère} génération (7,2 mg, 4,0 μmol) et de monomère pérylène **10** (35 mg, 47,9 μmol) dans le THF distillé (5 mL), a été ajouté le carbonate de césium (32 mg, 100 μmol). Le mélange réactionnel a été agité à 50°C pendant 12 h, centrifugé pour enlever le sel formé et le solvant évaporé. Le produit brut obtenu a été purifié par lavage/précipitation dans un mélange pentane/éther diéthylique puis par chromatographie sur colonne à gel de silice en utilisant acétone puis dichlorométhane/méthanol (9/1, v/v) comme éluant pour donner le dendrimère **11** sous forme de poudre verte très fine (83 %).

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz): = 8,23 (s, N_3P_3), 63,27 (s, $\text{P}=\text{S}$) ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz): = 1,31 – 1,65 (m, 36H, $\text{C}_{28}\text{-H}_{\text{ax}}$, $\text{C}_{27}\text{-H}_{\text{ax}}$), 1,70 – 2,25 (m, 156H, $\text{C}_{28}\text{-H}_{\text{eq}}$, $\text{C}_{26}\text{-H}_{\text{ax}}$, $\text{C}_{27}\text{-H}_{\text{eq}}$, $\text{C}_{30}\text{-H}$), 2,50 – 2,80 (sl, 72H, $\text{C}_{26}\text{-H}_{\text{eq}}$, $\text{C}_{29}\text{-H}$), 2,98 (sl, 24H, $\text{C}'_{\text{a}}\text{-H}$), 3,25 – 3,40 (m, 18H, N-CH_3), 3,53 (sl, 48H, $\text{C}_{29}\text{-H}'$), 4,32 (sl, 24H, $\text{C}'_{\text{b}}\text{-H}$), 5,11 (sl, 12H, CH-N), 6,85 – 7,00 (m, 12H, $\text{C}_0^2\text{-H}$), 7,15 – 7,50 (m, 72H, $\text{C}'_{\text{o}}\text{-H}$, $\text{C}'_{\text{m}}\text{-H}$, $\text{C}_6\text{-H}$, $\text{C}_{12}\text{-H}$), 7,60 – 8,00 (m, 18H, $\text{C}_0^3\text{-H}$, CH=N), 8,00 – 8,40 (m, 48H, $\text{C}_5\text{-H}$, $\text{C}_{11}\text{-H}$, $\text{C}_2\text{-H}$, $\text{C}_8\text{-H}$) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz): = 25,74 (sl, C_{28} , C_{30}), 26,68 (s, C_{27}), 29,20 (s, C_{26}), 33,19 (sl, N-CH_3), 33,61 (s, C'_{a}), 41,69 (s, C'_{b}), 51,99 (s, C_{29}), 53,77 (s, C_{25}), 117,43 (s, C_{19}), 117,82 (s, C_{17}), 118,24 (s, C_{22}), 119,40 (s, C_{23}), 120,32 (s, C_2), 120,65 (s, C_8), 120,94 (sl, C_3 , C_0^2), 121,54, 121,88 (m, C'_{o} , C_{21} , C_{24} , C_9), 123,00 (s, C_6), 123,65 (s, C_{12}), 126,38 (sl, C_5 , C_{11}), 128,44 (sl, C_0^3), 129,37 (s, C_{10} , C_4), 130,18 (s, C'_{m}), 133,62 (s, C_{18} , C_{20}), 136,33 (s, C'_{p}), 146,05 (s, C_1), 146,26 (s, C_7), 149,10 (sl, C'_{i}), 163,44 (s, C_{14} , C_{13}), 164,32 (s,), 164,45 (s, C_{16} , C_{15}) ppm.

Composé 12 : chloro-N-[2-(4-hydroxy-phényl)-éthyl]-acétamide



A une solution de tyramine (1,543 g, 11,22 mmol) dans un mélange de 25 mL de dichlorométhane/solution saturée en carbonate de sodium (1/1), a été ajouté le chlorure de chloroacétyle (0,896 mL, 11,22 mmol). Le mélange réactionnel a été agité pendant 2 h à température ambiante. Il a été dilué dans 50 mL d'eau distillée puis extrait au dichlorométhane (150 mL). La phase organique a été séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée à sec pour donner un produit blanc qui a ensuite été purifié par chromatographie sur colonne à gel de silice en utilisant dichlorométhane/méthanol (97/3, v/v) comme éluant pour donner un solide blanc (75 %).

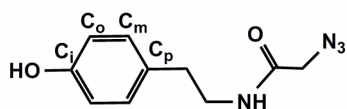
RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz): = 2,61 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,5$ Hz, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 3,24 (td, $^3J_{\text{HH}} = 7,5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5,1$ Hz, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 4,03 (s, 2H, CO-CH_2), 6,68

(m, 2H, C_o-H), 6,99 (d, ³J_{HH} = 8,4 Hz, 2H, C_m-H), 8,23 (t, ³J_{HH} = 5,1 Hz, 1H, NH), 9,17 (s, 1H, OH) ppm;

RMN ¹³C{¹H} (CDCl₃, 50,3 MHz): = 34,3 (s, C₆H₄-CH₂-CH₂-NH), 41,2 (s, CO-CH₂-Cl), 42,5 (s, C₆H₄-CH₂-CH₂-NH), 115,5 (s, C_o), 128,9 (s, C_m), 155,7 (s, C_i), 165,9 (s, CO) ppm.

SM-DCI (NH₃): 231 [M+NH₄]⁺, 214 [M+H]⁺

Composé 13 : 2-azido-N-[2-(4-hydroxy-phényl)-éthyl]-acétamide

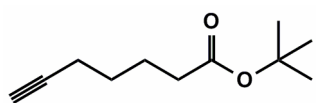


A une solution de phenol **12** (250 mg, 1,17 mmol) dans le DMSO (3 mL) a été ajouté l'azoture de sodium (152 mg, 2,34 mmol) et le mélange réactionnel a été agité pendant 12 h à température ambiante. Le mélange a ensuite été dilué dans 70 mL d'eau distillée et extrait à l'acétate d'éthyle (140 mL). La phase organique a été séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée pour donner le phénol **13** sous forme d'une huile visqueuse (90 %).

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): = 2,75 (t, ³J_{HH} = 6,9 Hz, 2H, C₆H₄-CH₂-CH₂-NH), 3,51 (td, ³J_{HH} = 6,9 Hz, ³J_{HH} = 6,3 Hz, 2H, C₆H₄-CH₂-CH₂-NH), 3,95 (s, 2H, CO-CH₂-N), 6,51 (sl, 1H, NH), 6,82 (m, 2H, C_o-H), 7,02 (m, 2H, C_m-H), 7,38 (sl, 1H, OH) ppm.

RMN ¹³C{¹H} (CDCl₃, 75,5 MHz): = 34,6 (s, C₆H₄-CH₂-CH₂-NH), 40,9 (s, C₆H₄-CH₂-CH₂-NH), 52,6 (s, CO-CH₂-N), 115,7 (s, C_o), 129,5 (s, C_p), 129,7 (s, C_m), 155,3 (s, C_i), 167,1 (s, CO) ppm.

Composé 14 : Tert-butyl 6-heptynoate ester

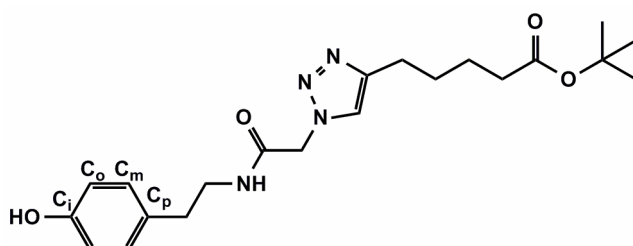


A une solution de DMAP (73 mg, 0,597 mmol), *tert*-butanol (1,7 mL, 17,91 mmol) et acide heptynoïque (0,75 mL, 5,97 mmol) dans 12 mL de dichlorométhane, a été ajouté N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (1,416 g, 6,864 mmol). Le mélange a été agité pendant 12 h à température ambiante, puis filtré et lavé avec 60 mL de dichlorométhane et 30 mL d'éther diéthylique. Les phases organiques ont été combinées et évaporées à sec. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne à gel de silice en utilisant pentane/éther diéthylique (97/3, v/v) comme éluant pour donner l'ester **14** sous forme d'huile incolore (56 %).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): = 1,45 (s, 9H, CH_3), 1,57 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 1,70 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 1,96 (t, $^4J_{\text{HH}} = 2,6$ Hz, 1H, CH), 2,23 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CO}$, C- CH_2) ppm,

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 62,9 MHz): = 18,2 (C- CH_2), 24,1 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 27,8 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 28,1 (s, CH_3), 35,0 (s, $\text{CH}_2\text{-CO}$), 68,5 (s, CH), 84,1 (s, C- CH_2), 172,8 (s, CO) ppm,

Composé **15** : Bras-espaceur protégé



A un mélange de phenol **13** (403 mg, 1,830 mmol), ester **14** (334 mg, 1,830 mmol) dans 2,4 mL de *tert*-butanol/eau distillée (1/1), ont été ajoutés l'ascorbate de sodium (36 mg, 0,183 mmol) et le sulfate de cuivre (14,6 mg, 0,09 mmol). Le mélange a été agité pendant 12 h à 25°C. Il a ensuite été dilué avec 1 mL de THF et 16 mL d'eau distillée, agité pendant 10 min, et extrait à l'acétate d'éthyle. La phase organique récupérée a été lavée avec une solution saturée de NaCl, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée pour donner un solide gluant qui a ensuite été purifié par colonne chromatographie sur gel de silice en utilisant éther

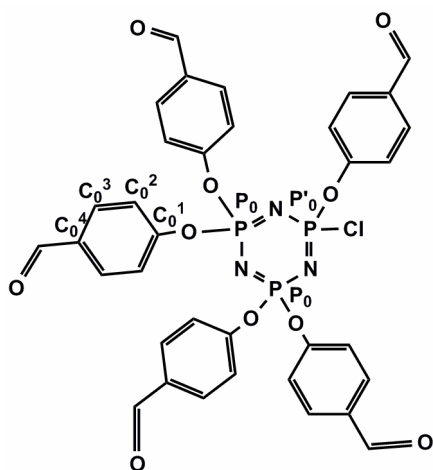
diéthylique/pentane (2/8, v/v) puis éther diéthylique/acétone (6/4, v/v) comme éluant pour donner le bras **15** sous forme de solide gluant incolore (81,5 %).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): = 1,41 (s, 9H, CH_3), 1,62 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 2,23 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 2,65 (m, 4H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 3,43 (q, $^3J_{\text{HH}} = 6,3$ Hz, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 4,92 (s, 2H, $\text{CO-CH}_2\text{-N}$), 6,60 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,5$ Hz, 1H, NH), 6,72 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 2H, $\text{C}_o\text{-H}$), 6,86 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 2H, $\text{C}_m\text{-H}$), 7,38 (s, 1H, N-CH=C) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz): = 24,6 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 25,6 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 28,1 (s, CH_3), 28,4 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 34,0 (s, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 35,2 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 40,8 (s, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 53 (s, $\text{CO-CH}_2\text{-N}$), 80,8 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 115,6 (s, C_o), 122,3 (s, N-CH=C), 129,3 (s, C_p), 129,7 (s, C_m), 148,5 (N-CH=C), 155,4 (s, C_i), 165,4 (NH-CO-CH_2), 173,8 (s, CO_2) ppm.

SM-FAB (>0): $m/z = 403 [\text{M}+\text{H}]^+$, 347 $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9+2\text{H}]^+$.

Composé **16** : Cyclotriphosphazène pentasubstitué



A un mélange de 4-hydroxybenzaldéhyde (1,38 g, 11,3 mmol), carbonate de césium (4,418 g, 13,56 mmol) dans 40 mL de THF distillé à 0°C, a été ajouté l'hexachlorocyclotriphosphazène, et le mélange réactionnel a été agité pendant 12 h à température ambiante. Le mélange a été centrifugé pour enlever le sel formé et le solvant

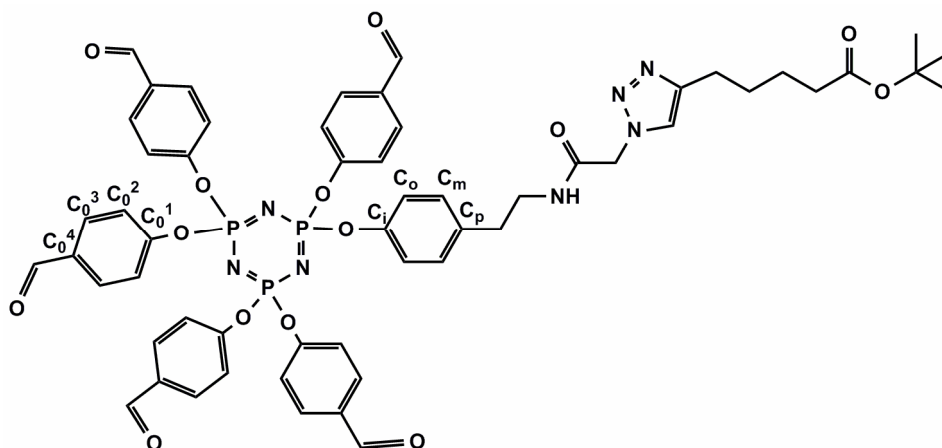
éaporé. Le produit brut a ensuite été purifié par chromatographie sur colonne à gel de silice en utilisant pentane/acétate d'éthyle (8/2 → 6/4, v/v) comme éluant pour donner une huile incolore (76 %).

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz): = 5,21 (d, $^2J_{\text{PP}} = 86,4$ Hz, P_0), 20,79 (dd, $^2J_{\text{PP}} = 88,5$ Hz, $^2J_{\text{PP}} = 84,6$ Hz, P_0') ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz): = 7,20 (m, 10H, $\text{C}_0^2\text{-H}$), 7,75 (m, 10H, $\text{C}_0^3\text{-H}$), 9,90 (2s, 5H, CHO) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz): = 121,5 (m, C_0^2), 131,5 (s, C_0^3), 133,9 (s, C_0^4), 134,0 (s, C_0^4), 154,3 (d, $^2J_{\text{CP}} = 17,1$ Hz, C_0^1), 190,4 (s, CHO), 190,5 (s, CHO) ppm.

Composé 17 : G'0 avec le bras protégé



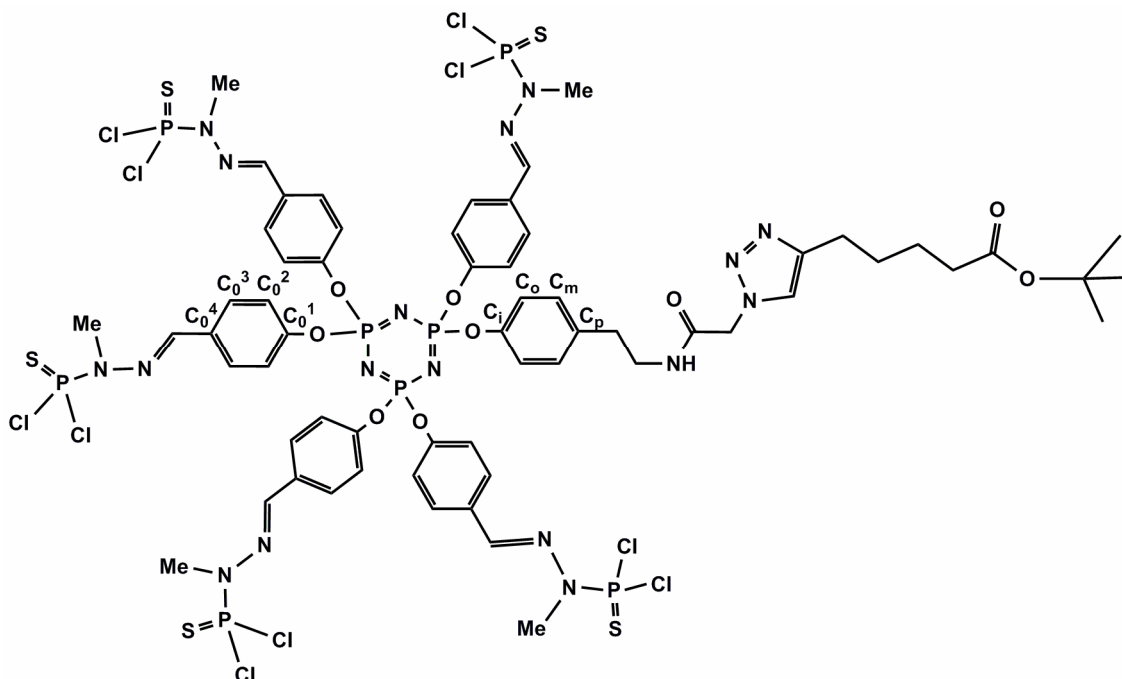
A une solution de **16** (200 mg, 0,26 mmol) et de **15** (114 mg, 0,28 mmol) dans le THF distillé (5 mL), a été ajouté le carbonate de césium (176,5 mg, 0,54 mmol). Le mélange réactionnel a été agité pendant 5 heures à température ambiante, centrifugé et le solvant évaporé. Le produit brut a été purifié ensuite par chromatographie sur colonne à gel de silice en utilisant acétate d'éthyle/hexane (7/3 → 8/2, v/v) comme éluant pour donner une huile incolore (37 %).

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz): = 7,37 (s, N_3P_3) ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz): = 1,43 (s, 9H, CH_3), 1,55 – 1,75 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 2,24 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 2,74 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,0$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 3,54 (q, $^3J_{\text{HH}} = 6,8$ Hz, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 4,98 (s, 2H, $\text{CO-CH}_2\text{-N}$), 6,37 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,4$ Hz, 1H, NH), 6,90 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 2H, $\text{C}_o\text{-H}$), 6,97 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 2H, $\text{C}_m\text{-H}$), 7,05 – 7,20 (m, 10H, $\text{C}_o^2\text{-H}$), 7,44 (s, 1H, N-CH=C), 7,65 – 7,85 (m, 10H, $\text{C}_o^3\text{-H}$), 9,94 (s, 5H, CHO) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 62,9 MHz): = 24,5 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 25,3 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 28,1 (s, CH_3), 28,6 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 34,7 (s, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 35,1 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 40,8 (s, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 53,0 (s, $\text{CO-CH}_2\text{-N}$), 80,2 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 120,7 (s, C_o), 121,3 (sl, C_o^2), 122,5 (s, N-CH=C), 129,9 (s, C_m), 130,9 (s, C_o^3), 133,7 (s, C_o^4), 135,9 (s, C_p), 148,7 (sl, N-CH=C , C_i), 154,6 (s, C_o^1), 165,4 (s, NH-CO-CH_2), 172,9 (s, CO_2), 190,4 (s, CHO), 190,5 (s, CHO), 190,6 (s, CHO) ppm.

Composé 18 : G1 avec le bras-espacer protégé



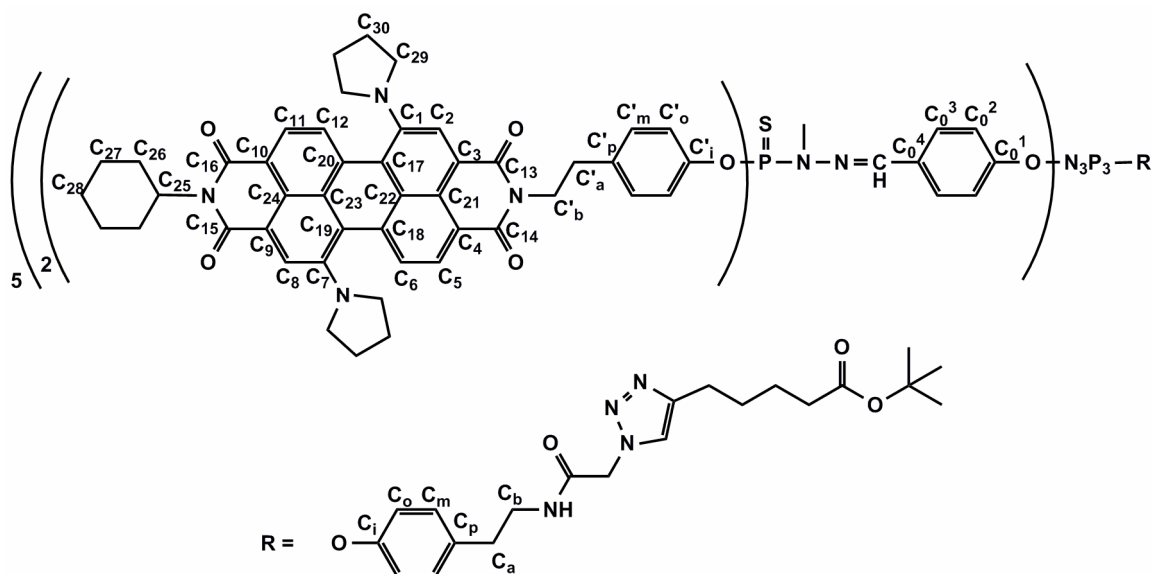
A une solution de **17** (110 mg, 0,096 mmol) dans le chloroforme (4 mL) à 0°C, ont été ajoutés 3 mL de N-méthyldichlorothiophosphorhydrazide (0,24 M in CHCl_3 , 0,72 mmol) et le

mélange réactionnel a été agité pendant 5 heures à température ambiante. Après évaporation du solvant, le résidu a été dilué dans un minimum de chloroforme et précipité dans une grande quantité de mélange pentane/ éther diéthylique (3/1, v/v). Cette étape de précipitation a été répétée deux fois de plus pour donner le dendrimère **18** sous forme d'huile visqueuse incolore (95 %).

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz): = 8,35 (sl, N_3P_3), 62,40 (s, P=S), 62,44 (s, P=S), 62,56 (s, P=S) ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz): = 1,45 (s, 9H, CH_3), 1,55 – 1,80 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_2\text{-CO}$), 2,24 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{-CO}$), 2,74 (m, , 4H, $\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_2\text{-NH}$), 3,43 (m, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{-NH}$), 3,50 (m, 15H, N- CH_3), 5,00 (s, 2H, CO- $\underline{\text{CH}_2}\text{-N}$), 6,37 (sl, 1H, NH), 6,85 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 2H, $\text{C}_o\text{-H}$), 6,95 – 7,15 (m, 12H, $\text{C}_m\text{-H}$, $\text{C}_0^2\text{-H}$), 7,49 (s, 1H, N-CH=C), 7,55 – 7,75 (m, 15H, $\text{C}_0^3\text{-H}$, CH=N) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz): = 24,5 (s, $\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 24,9 (s, $\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 28,1 (s, CH_3), 28,4 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_2\text{-CO}$), 32,0 (d, $^2J_{\text{CP}} = 12,9$ Hz, N- CH_3), 32,1 (d, $^2J_{\text{CP}} = 12,9$ Hz, N- CH_3), 34,7 (s, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_2\text{-NH}$), 35,1 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{-CO}$), 41,1 (s, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{-NH}$), 53,4 (s, CO- $\underline{\text{CH}_2}\text{-N}$), 80,2 (s, $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 121,1 (s, C_o), 121,3 (sl, C_0^2), 123,5 (s, N- $\underline{\text{CH}}=\text{C}$), 128,6 (s, C_m), 129,7 (s, C_0^3), 131,3 (s, C_0^4), 135,3 (s, C_p), 140,7 (m, CH=N), 147,7 (sl, N-CH= $\underline{\text{C}}$), 148,9 (m, C_i), 151,7 (s, C_0^1), 164,7 (s, NH- $\underline{\text{CO}}\text{-CH}_2$), 172,9 (s, CO_2) ppm.

Composé **19** : G1 Pérylène avec le bras-espaceur protégé

A une solution de **18** (11,4 mg, 5,86 μ mol) et de monomère pérylène **10** (45 mg, 61,6 μ mol) dans le THF distillé (5 mL), a été ajouté le carbonate de césium (40 mg, 123 μ mol). Le mélange réactionnel a été agité à 25°C pendant 12 h, centrifugé pour enlever le sel formé et le solvant évaporé. Le produit brut obtenu a été purifié par chromatographie sur colonne à gel de silice en utilisant acétone puis dichlorométhane/méthanol (9/1, v/v) comme éluant pour donner le dendrimère **19** sous forme de poudre verte (83 %).

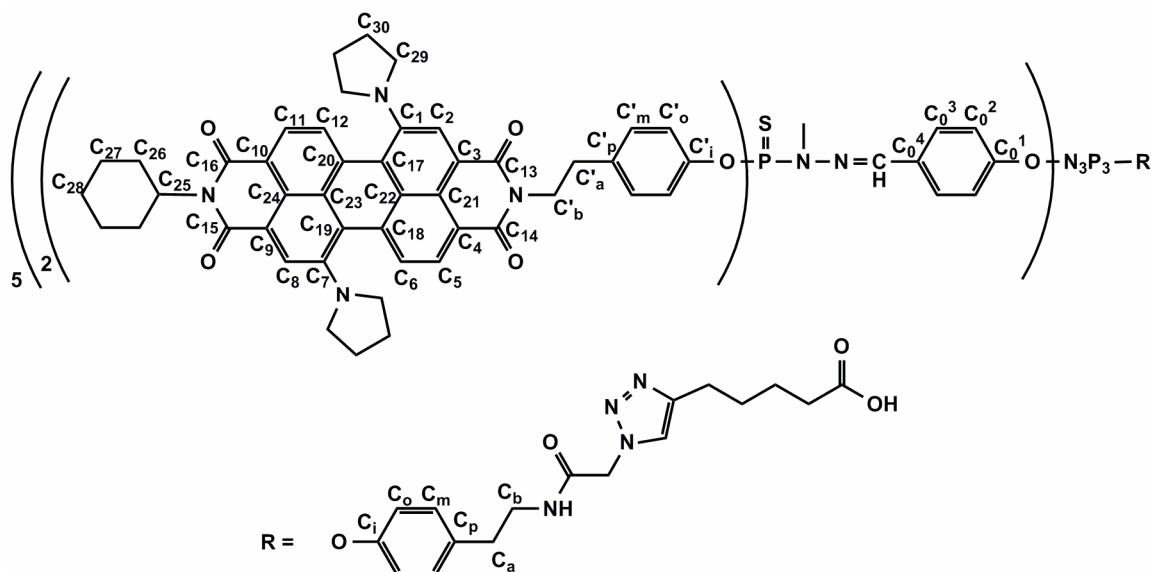
RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz): = 8,42 (m, N_3P_3), 63,30 (s, P=S) ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz): = 1,31 – 2,15 (m, 173H, $\text{C}_{28}\text{-H}_{\text{ax}}$, $\text{C}_{27}\text{-H}_{\text{ax}}$, $\text{C}_{28}\text{-H}_{\text{eq}}$, $\text{C}_{26}\text{-H}_{\text{ax}}$, $\text{C}_{27}\text{-H}_{\text{eq}}$, $\text{C}_{30}\text{-H}$, CH_3 , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 2,24 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 2,45 – 2,90 (sl, 64H, $\text{C}_{26}\text{-H}_{\text{eq}}$, $\text{C}_{29}\text{-H}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$, $\text{C}_a\text{-H}$), 2,90 – 3,10 (sl, 20H, $\text{C}'_a\text{-H}$), 3,25 – 3,40 (m, 15H, N- CH_3), 3,55 (sl, 42H, $\text{C}_{29}\text{-H}'$, $\text{C}_b\text{-H}$), 4,33 (sl, 20H, $\text{C}'_b\text{-H}$), 4,95 (s, 2H, CO- $\text{CH}_2\text{-N}$), 5,11 (sl, 10H, CH-N), 6,85 – 7,15 (m, 14H, $\text{C}_o\text{-H}$, $\text{C}_m\text{-H}$, $\text{C}_0^2\text{-H}$), 7,15 – 7,50 (m, 40H, $\text{C}'_o\text{-H}$, $\text{C}'_m\text{-H}$), 7,60 – 8,00 (m, 35H, $\text{C}_6\text{-H}$, $\text{C}_{12}\text{-H}$, $\text{C}_0^3\text{-H}$, CH=N), 8,00 – 8,40 (m, 40H, $\text{C}_5\text{-H}$, $\text{C}_{11}\text{-H}$, $\text{C}_2\text{-H}$, $\text{C}_8\text{-H}$) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz): = 25,72 (sl, C_{28} , C_{30}), 26,67 (s, C_{27}), 28,10 (s, CH_3), 29,20 (s, C_{26}), 33,19 (sl, N- CH_3), 33,63 (s, C'_a), 41,68 (s, C'_b), 52,02 (s, C_{29}), 53,78 (m, C_{25}), 117,43 (s, C_{19}), 117,82 (s, C_{17}), 118,31 (s, C_{22}), 119,43 (s, C_{23}), 120,30 (s, C_2), 120,65 (s,

C₈), 120,95 (sl, C₀²), 121,53 (s, C'_o), 121,90 (m, C₂₁, C₂₄), 122,10 (sl, C₉), 123,00 (s, C₆), 123,62 (s, C₁₂), 126,38 (sl, C₅, C₁₁), 128,46 (sl, C₀³), 129,37 (s, C₁₀, C₄), 130,18 (s, C'_m), 133,63 (s, C₁₈, C₂₀), 136,34 (s, C'_p), 146,05 (s, C₁), 146,29 (s, C₇), 149,2 (sl, C'_i), 163,46 (s, C₁₄, C₁₃), 164,32 (s, C₁₆), 164,45 (s, C₁₅) ppm. Les autres carbones, notamment les carbones quaternaires de la structure dendritique ainsi que les carbones du bras espaceur ne sont pas observés.

Composé **20** : G1 Pérylène avec le bras-espaceur



Le dendrimère **19** (45 mg, 5,06 mmol) a été solubilisé dans 3 mL d'acide trifluoroacétique 25 % dans le dichlorométhane, et le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 1,5 heures puis évaporé à sec sous vide. Cette séquence a été répétée 6 fois jusqu'à la disparition du signal correspondant au *tert*-butyle en RMN ¹H. La poudre obtenue a été lavée au méthanol pour enlever l'excès d'acide trifluoroacétique et séché sous vide pour donner un solide vert (rendement quantitatif).

RMN ³¹P{¹H} (CDCl₃, 300,1 MHz): = 8,33 (m, N₃P₃), 62,26 (s, P=S) ppm.

RMN ¹H (CDCl₃, 300,1 MHz): = 1,31 – 2,15 (m, 164H, C₂₈-H_{ax}, C₂₇-H_{ax}, C₂₈-H_{eq}, C₂₆-H_{ax}, C₂₇-H_{eq}, C₃₀-H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO), 2,24 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO), 2,45 – 2,90 (sl, 64H, C₂₆-H_{eq}, C₂₉-H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO, C_a-H), 2,90 – 3,10 (sl, 20H, C'_a-H), 3,25 – 3,70 (m, 57H, N-CH₃, C₂₉-H', C_b-H), 4,33 (sl, 20H,

C_b-H), 4,95 (s, 2H, CO-CH₂-N), 5,11 (sl, 10H, CH-N), 6,85 – 7,50 (m, 54H, C_o-H, C_m-H, C₀²-H, C_o'-H, C_m'-H), 7,60 – 8,00 (m, 30H, C₆-H, C₁₂-H, C₀³-H), 8,00 – 8,40 (m, 40H, C₅-H, C₁₁-H, C₂-H, C₈-H) ppm.

RMN ¹³C{¹H} (CDCl₃, 75,5 MHz): = 25,73 (s, C₂₈, C₃₀), 26,67 (s, C₂₇), 29,20 (s, C₂₆), 33,28 (sl, N-CH₃), 33,60 (s, C_a'), 41,64 (s, C_b'), 52,00 (s, C₂₉), 53,76 (s, C₂₅), 117,40 (s, C₁₉), 117,90 (s, C₁₇), 118,22 (s, C₂₂), 119,42 (s, C₂₃), 120,35 (s, C₂), 120,64 (s, C₈), 120,92 (sl, C₀²), 121,54 (s, C_o'), 121,88 (m, C₂₁, C₂₄), 122,05 (sl, C₉), 122,98 (s, C₆), 123,62 (s, C₁₂), 126,38 (sl, C₅, C₁₁), 128,33 (sl, C₀³), 129,38 (s, C₁₀, C₄), 130,17 (s, C_m'), 133,60 (s, C₁₈, C₂₀), 136,31 (s, C_p'), 140,99, 146,04 (s, C₁), 146,24 (s, C₇), 149,0 (sl, C_i'), 163,47 (s, C₁₄, C₁₃), 164,31 (s, C₁₆), 164,43 (s, C₁₅) ppm. Les autres carbones, notamment les carbones quaternaires de la structure dendritique ainsi que les carbones du bras ne sont pas observés.

Couplage du dendrimère pérylène **20** à la protéine

Activation de l'acide carboxylique

A une solution de dendrimère **20** (2,5 mg, 0,28 μmol) et N-hydroxysuccinimide (0,065 mg, 0,56 μmol) dans le dichlorométhane distillé (1 mL), a été ajouté le diisopropylcarbodiimide (0,14 mg, 1,12 μmol). Le mélange réactionnel a été agité sous Ar à température ambiante pendant 3,5 h, évaporé sous vide et gardé sous Ar.

Couplage à la protéine (ASB ou anticorps)

Le dendrimère activé (50,32 μg, 5,66E-9 mol) a été solubilisé dans un mélange de DMF/Dioxane (1/1, v/v) et est mélangé aussitôt avec l'ASB (37,6 μg, 5,66E-10 mol) ou l'Anticorps (42,5 μg, 5,66E-10 mol) dans le tampon phosphate pH 7,4. Le mélange a été vortexé et agité fortement à température ambiante pendant 3 heures. Le mélange a ensuite été filtré sur membrane ayant un seuil de coupure de 50000 Da, la partie retenue a été reprise dans le tampon phosphate pH 7,4 pour donner le dendrimère pérylène couplé à la protéine en solution.

Chapitre

3

Dendrimères polycationiques pour la transfection

Table des matières

3.1	Introduction	130
3.2	Vers un nouveau dendrimère polycationique	132
3.3	Dendrimère maléimide polycationique	139
3.3.1	Synthèse du dendrimère maléimide polycationique.....	139
3.3.2	Fluorescence et propriétés physico-chimiques.....	143
3.3.3	Propriétés biologiques.....	146
3.3.3.1	Cytotoxicité du dendrimère maléimide polycationique.....	146
3.3.3.2	Interactions supramoléculaires avec l'ADN plasmidique.....	147
3.4	Conclusion	150
3.5	Partie expérimentale	151

3.1 Introduction

Les dendrimères PAMAM polycationiques sont souvent utilisés dans le domaine de la biotechnologie comme vecteur de gènes pour réaliser la transfection¹ (l'introduction d'ADN exogène dans les cellules eucaryotes, par opposition à la transduction qui est assurée par des vecteurs viraux). Récemment, des dendrimères phosphorés polycationiques ont également été montrés capables de transporter l'ADN plasmidique dans les cellules^{2,3,4,5}. Ces dendrimères phosphorés polycationiques sont obtenus par introduction de deux équivalents de N,N-diéthyléthylène diamine sur chaque groupement terminal P(S)Cl₂ par une réaction de substitution nucléophile dans le THF. L'amine tertiaire terminale est capable de piéger l'acide chlorhydrique généré lors de la réaction et de rendre ainsi le dendrimère soluble dans l'eau (cf. Figure 3-1). Cette réaction simple et facile à mettre en œuvre a été appliquée à des dendrons et des dendrimères phosphorés contenant des cœurs différents tels que le cyclotriphosphazène^{4,6} et la phthalocyanine⁷ jusqu'à la 5^{ème} génération. La solubilité dans l'eau du dendrimère phosphoré pour la transfection pourrait être améliorée par augmentation du nombre de charges positives à sa surface en greffant sur celui-ci des polyamines naturelles telles que la spermine et la spermidine à la place des diamines classiquement utilisées. Nous avons donc essayé de mettre au point la synthèse d'un nouveau dendrimère polycationique pour la transfection en utilisant la spermine comme groupement hydrophile de surface. Nos essais seront décrits dans la première partie de ce chapitre.

¹ Svenson S., Tomalia D.A., *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2005**, 57, 2106.

² Maszewska M., Leclaire J., Cieslak M., Nawrot B., Okruszek A., Caminade A.-M. and Majoral J.-P. *Oligonucleotides* **2003**, 13, 193.

³ Padié C., Maszewska M., Majchrzak K., Nawrot B., Caminade A.-M. and Majoral J.-P. *New. J. Chem.* **2009**, 33, 318.

⁴ Loup C., Zanta M.A., Caminade A.-M., Majoral J.-P. and Meunier B. *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 3644.

⁵ Maksimenko A.V., Mandrouguine V., Gottikh M.B., Bertrand J.-R., Majoral J.-P. and Malvy C. *J. Gene. Med.* **2003**, 5, 61.

⁶ Caminade A.-M. and Majoral J.-P. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, 30, 491.

⁷ Leclaire J., Coppel Y., Caminade A.-M. Majoral J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2304.

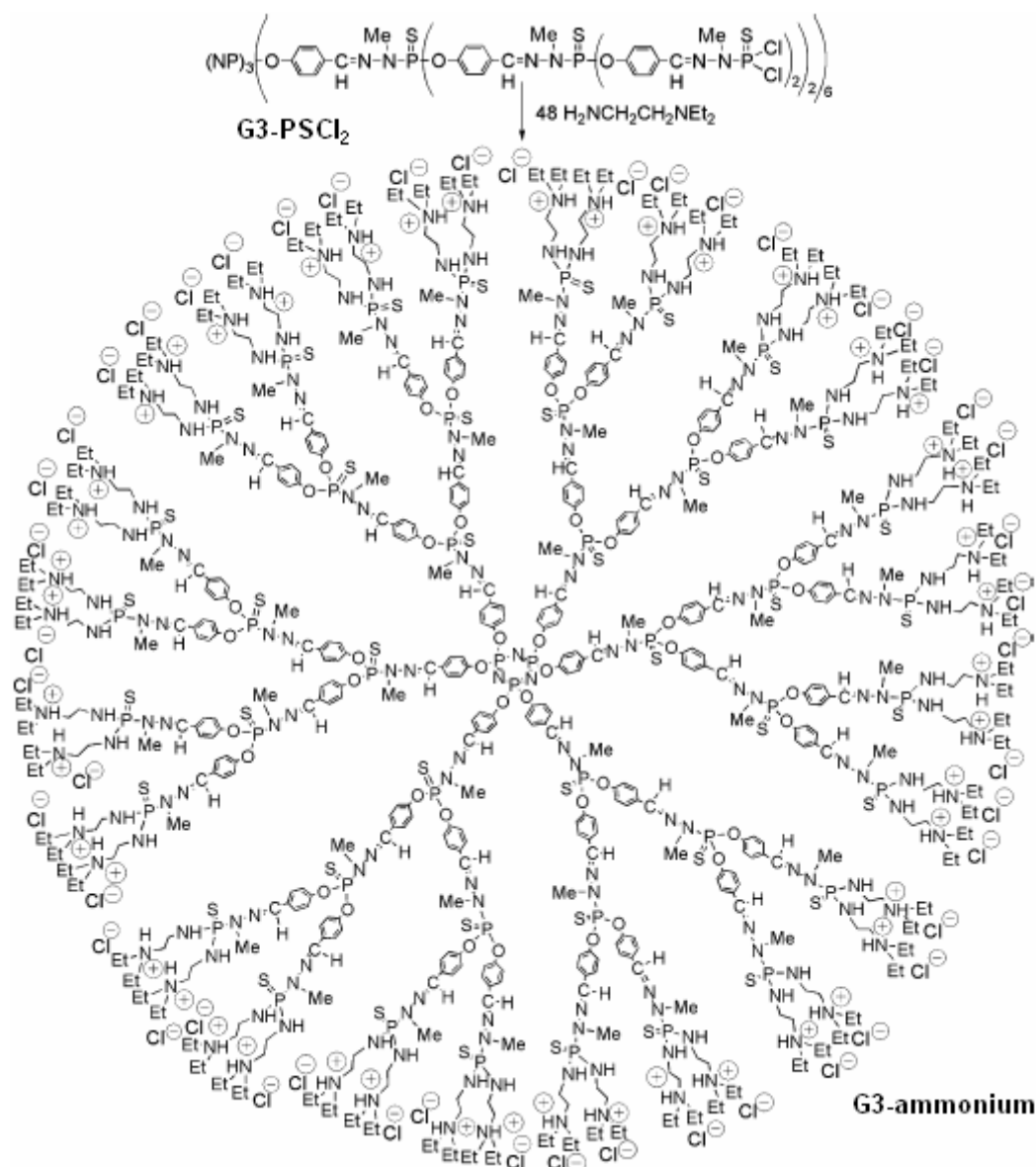


Figure 3-1 : Synthèse d'un dendrimère phosphoré ammonium⁶

Afin de mieux comprendre l'utilisation des dendrimères comme agents de transfection, un mécanisme qui implique des interactions macromoléculaires à toutes les étapes a été proposé. Les dendrimères polycationiques s'associent avec l'ADN négativement chargé pour former des complexes solides appelés dendriplexes par des interactions électrostatiques. Un excès de charges positives apportées par les dendrimères permet aux dendriplexes d'interagir avec les membranes cellulaires négativement chargées et d'être internalisés par endocytose dans le cytoplasme où ces dendriplexes se dissocient vraisemblablement sous l'influence des lipides cationiques. Néanmoins, le passage de l'ADN du cytoplasme dans le noyau pour être exprimé ainsi que le devenir du dendrimère après la transfection restent inconnus. Afin de

comprendre ce mécanisme biologique, nous avons développé un dendrimère fluorescent polycationique portant un dérivé maléimide directement lié au cœur dont la synthèse ainsi que les propriétés photophysiques et biologiques sont rapportées dans la deuxième partie de ce chapitre.

3.2 Vers un nouveau dendrimère polycationique

Afin d'augmenter la solubilité du dendrimère dans l'eau, une méthode efficace serait d'augmenter le nombre de charges positives par dendrimère en greffant sur celui-ci des polyamines naturelles telles que la spermidine et la spermine. La spermidine et la spermine sont des polyamines linéaires (cf. Figure 3-2) impliquées dans le métabolisme cellulaire, qui se trouvent dans la plupart des cellules animales^{8,9,10}, elles jouent un rôle très important *in vivo*¹¹. Par exemple, la maintenance de la structure 3D des ADN^{12,13,14} par condensation^{15,16} est un des rôles biologiques cruciaux de ces polyamines. La spermidine et la spermine contiennent des chaînes de 3 à 4 méthylènes entre les groupements amine, ce qui permet une protonation complète de ces molécules à pH physiologique, c'est-à-dire que toutes les amines sont sous forme ammonium à pH 7,4¹⁷. Une fois greffées sur le dendrimère, ces polyamines permettraient d'augmenter la solubilité du dendrimère phosphoré dans l'eau grâce à de multiples cations en milieux physiologiques.

⁸ Geall A. J. and Blagbrough I. S. *Tetrahedron* **2000**, 56, 2449.

⁹ Blagbrough I. S., Al-Hadithi D. and Geall A. J. *Tetrahedron* **2000**, 56, 3439.

¹⁰ Blagbrough I. S. and Geall A. J. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 439.

¹¹ Blagbrough I. S., Carrington S. and Geall A. J. *Pharm. Sci.* **1997**, 3, 223.

¹² Rowatt E. and Williams R. J. P. *J. Inorg. Biochem.* **1992**, 46, 87.

¹³ Stewart K. D. and Gray T. A. *J. Phys. Org. Chem.* **1992**, 5, 461.

¹⁴ Remy J.-S., Sirlin C., Vierling P. and Behr J.-P. *Bioconjugate Chem.* **1994**, 5, 647.

¹⁵ Wilson R. W. and Bloomfield V. A. *Biochemistry* **1979**, 18, 2192.

¹⁶ Bloomfield V. A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 334.

¹⁷ Moya E. and Blagbrough I. S. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 9401.

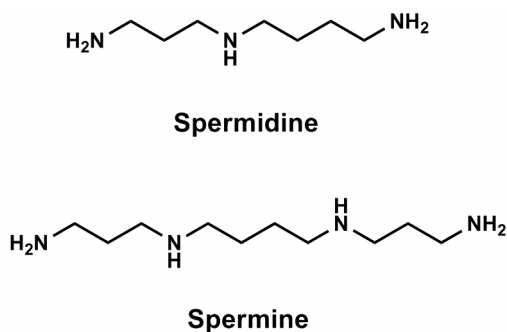
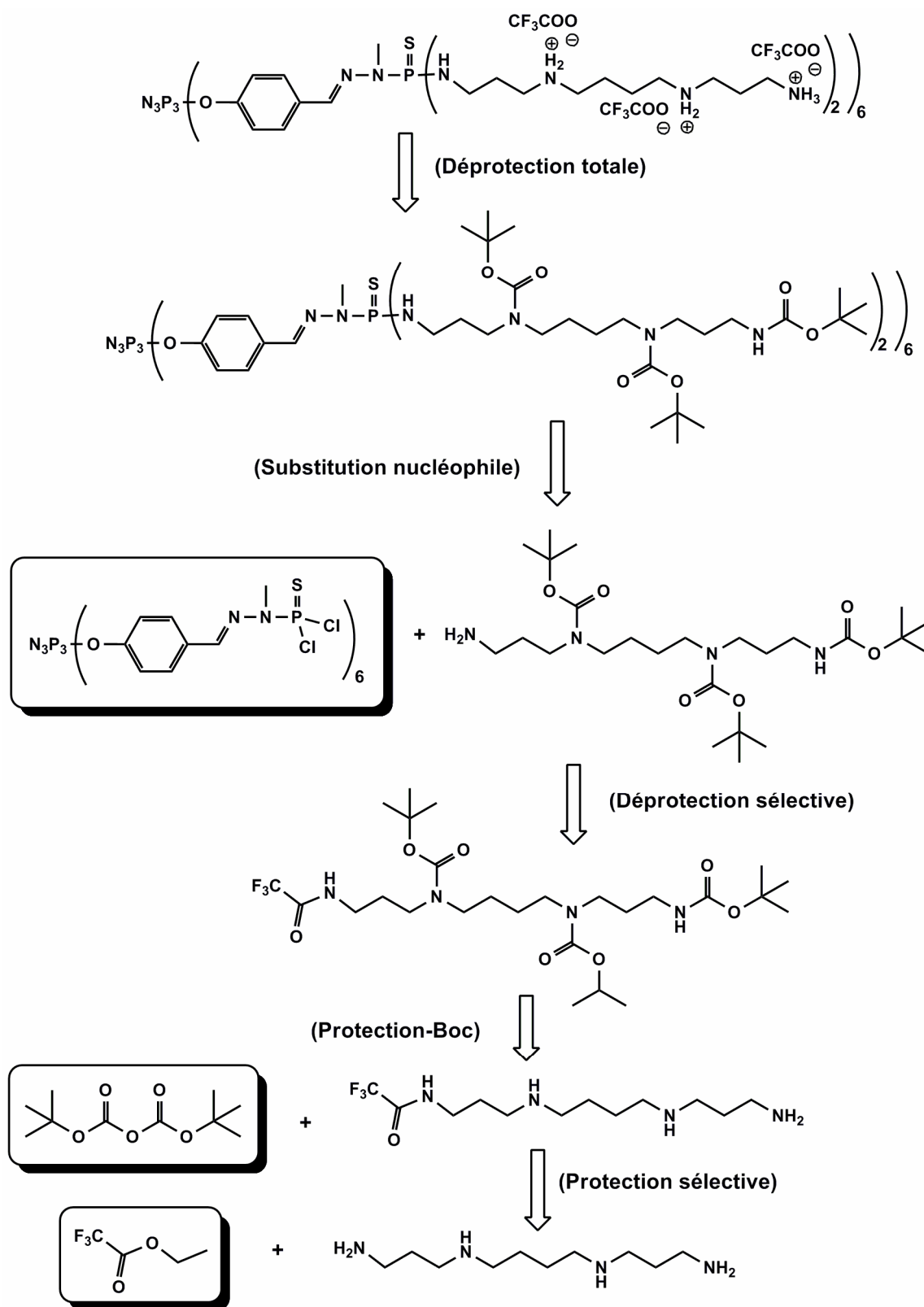


Figure 3-2 : La spermidine et la spermine

Ces polyamines ne peuvent pas être greffées directement, faute de sélectivité de la réaction de substitution nucléophile sur les groupements thiophosphine du dendrimère. Il est donc nécessaire d'effectuer des étapes de protection afin de laisser une seule amine primaire disponible pour le greffage. Etant donné que la spermidine est dissymétrique, ce qui rajouterait un degré de difficulté dans la protection asymétrique des amines, c'est la spermine qui a été choisie pour un test de faisabilité (cf. Figure 3-3).

La faisabilité de la protection sélective repose sur la différence de réactivité entre les amines primaires et secondaires. En jouant sur les groupements protecteurs (cf. Figure 3-4) qui ont des conditions de déprotection différentes (le groupement trifluoroacétyle est enlevé en milieu basique tandis que les groupements boc s'enlèvent en milieu acide), il est possible d'obtenir une spermine protégée ayant une seule amine primaire libre. Cette spermine protégée pourra ensuite être greffée sur le dendrimère et les amines seront libérées et protonées *in situ* par l'action de l'acide trifluoroacétique (cf. Chapitre II).

Figure 3-3 : Rétrosynthèse du dendrimère spermine de 1^{ère} génération

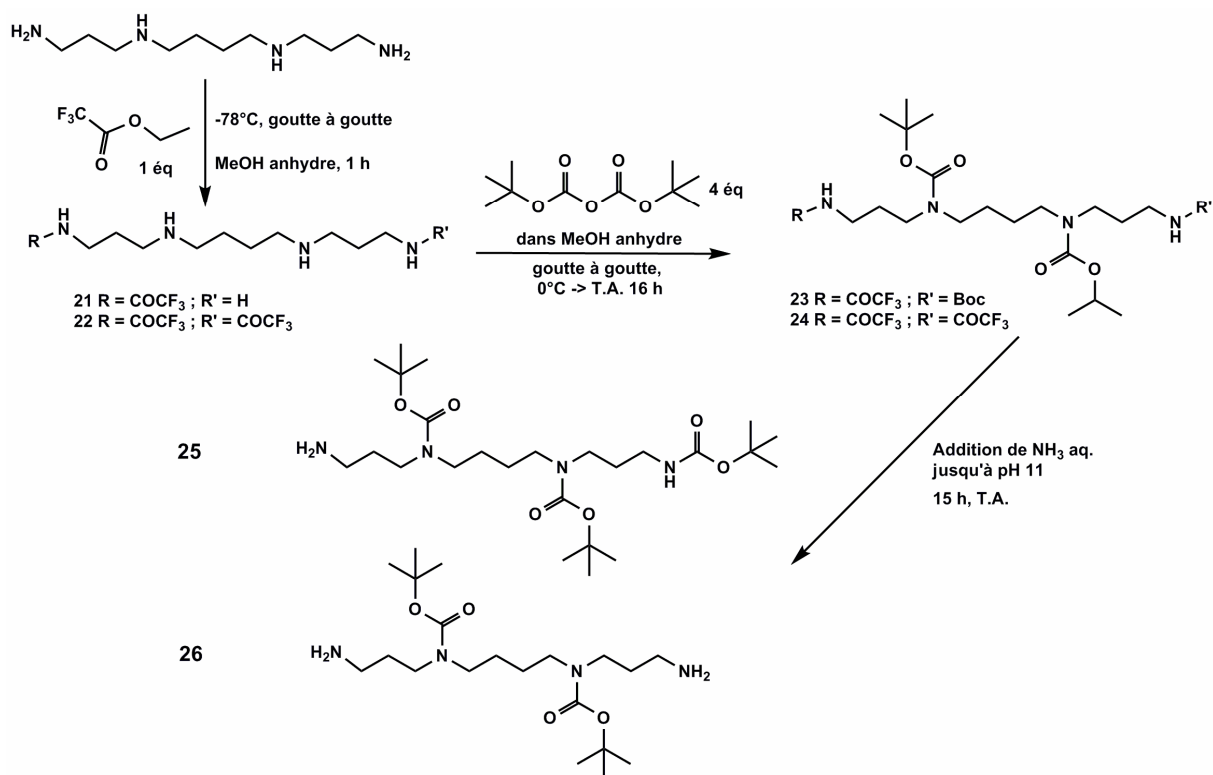


Figure 3-4 : Synthèse de la spermine-3-Boc

La mono-protection des amines primaires de la spermine se fait par l'addition goutte à goutte du trifluoroacétate d'éthyle à -78°C pendant 1 heure. Le trifluoroacétate d'éthyle a l'avantage de réagir préférentiellement sur les amines primaires¹⁸, la température basse et l'addition goutte à goutte permet de minimiser la protection des deux amines primaires (cf. Figure 3-4) qui est tout de même inévitable. La réaction peut être suivie par CCM où une nouvelle tache intense apparaît (révélateur : ninhydrine). Sans isoler le produit, une solution de di-*tert*-butyldicarbonate dans le méthanol anhydre est ajoutée goutte à goutte durant 1 heure au mélange réactionnel puis la réaction est agitée pendant 15 heures de plus pour permettre la protection de toutes les amines restantes. Le groupement protecteur trifluoroacétyl peut ensuite être facilement enlevé *in situ* par ajout de l'ammoniaque¹⁹ (pH = 11). Après évaporation des solvants, une extraction au dichlorométhane est nécessaire afin de récupérer uniquement les différentes formes de spermine. Le brut réactionnel doit contenir à la fois la spermine-3-Boc et la spermine-2-Boc et par conséquent la spermine-4-Boc (non

¹⁸ a) O'Sullivan M. C. and Dalrymple D. M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 3451 ; b) Xu D., Prasad K., Repic O., Blacklock T. J. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 7357.

¹⁹ Imazawa M., Eckstein F. *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 2039.

représentée sur le schéma de synthèse) car un seul équivalent de trifluoroacétate d'éthyle par molécule de spermine a été introduit au départ. Ce mélange a été purifié par chromatographie sur colonne de silice pour donner la spermine-3-Boc **25** sous forme d'huile jaune visqueuse avec un rendement global de 57 %. Le produit **25** est caractérisé en RMN ^1H par un triplet à 2,65 ppm (CDCl_3) qui s'intègre pour 2 protons et qui correspond aux protons en α de l'amine primaire libre. L'analyse par spectrométrie de masse en ionisation chimique confirme également la structure du produit avec $[\text{M}+\text{H}]^+$ égale à 503,6.

Avec une seule amine primaire libre, cette spermine-3-Boc peut être greffée sur le dendrimère phosphoré. Une première tentative de greffage a été réalisée sur un dendrimère de 1^{ère} génération afin de simplifier l'analyse du spectre RMN de la réaction. La substitution nucléophile se fait dans le THF distillé en présence de la triéthylamine distillée qui remplace le carbonate de césium utilisé dans le cas de la substitution nucléophile par un phénol (cf. Figure 3-5).

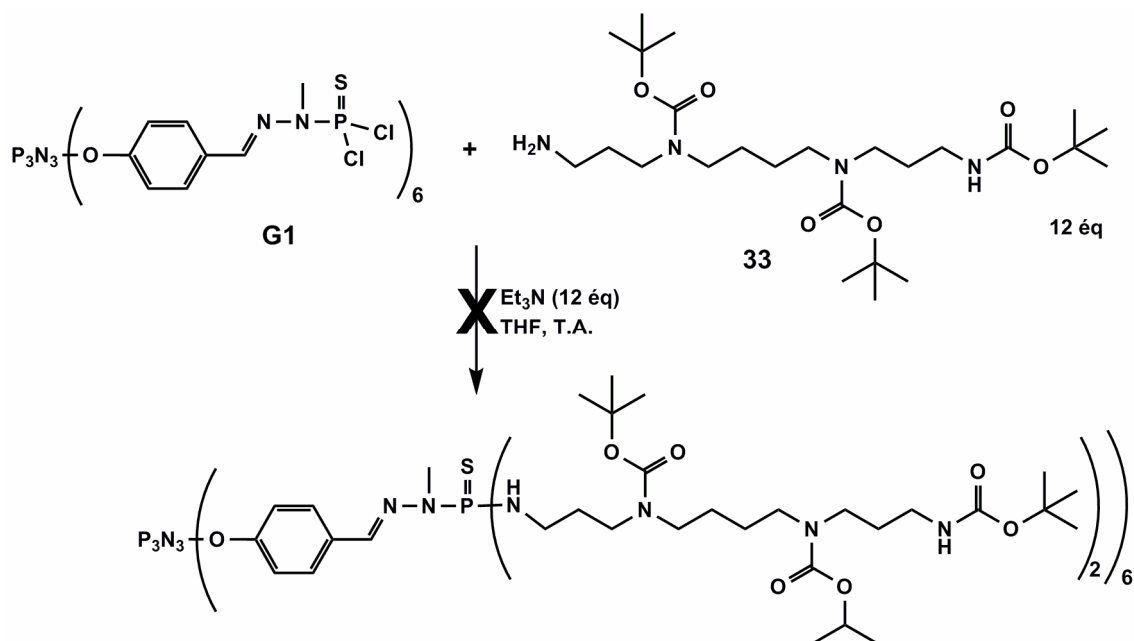


Figure 3-5 : Tentative de synthèse du dendrimère spermineBoc

Néanmoins, la substitution complète de tous les atomes de chlore n'a pas pu se faire. Au bout d'un jour d'agitation à température ambiante et sous argon, la RMN ^{31}P (cf. Figure 3-6) indique qu'il y a principalement le produit de la mono-substitution des groupements thiophosphine caractérisé par un signal à 77,86 ppm (C_6D_6). Le signal à 72,94 ppm (C_6D_6)

correspondant à la di-substitution a commencé à apparaître. L'atome de phosphore du cœur cyclotriphosphazène est caractérisé par un signal singulet à 12,45 ppm (C_6D_6) et montre que la structure dendritique est intacte. La réaction est laissée sous agitation 4 jours de plus pour permettre la substitution complète des groupements thiophosphine tout en suivant au jour le jour la réaction par RMN ^{31}P . Au bout de 5 jours de réaction, non seulement la réaction n'est pas terminée, mais le dendrimère est complètement dégradé (cf. Figure 3-7). L'expérience a été répétée plusieurs fois, soit dans les mêmes conditions, soit en utilisant un dendrimère de 3^{ème} génération, des résultats similaires ont été observés : la mono-substitution se fait relativement rapidement et proprement, mais une prolongation d'agitation dans l'objectif de permettre une réaction complète conduit systématiquement à la dégradation du dendrimère.

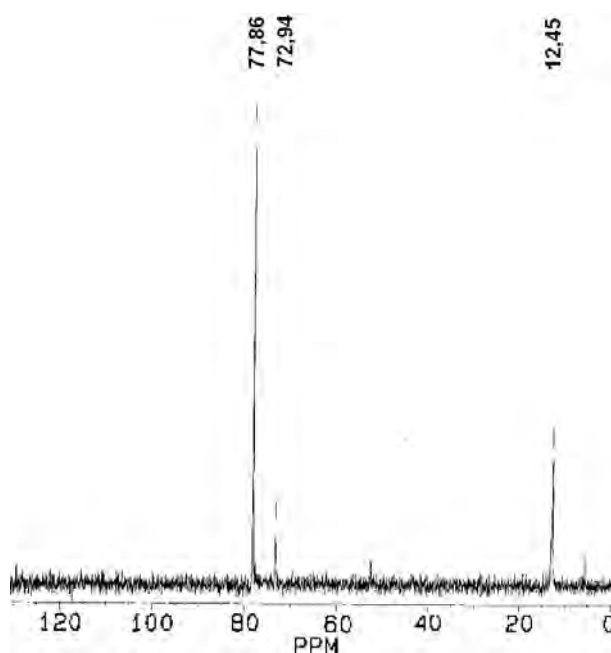


Figure 3-6 : Réaction de la substitution de la spermine-3-Boc sur un dendrimère de 1^{ère} génération au bout de 1 jour

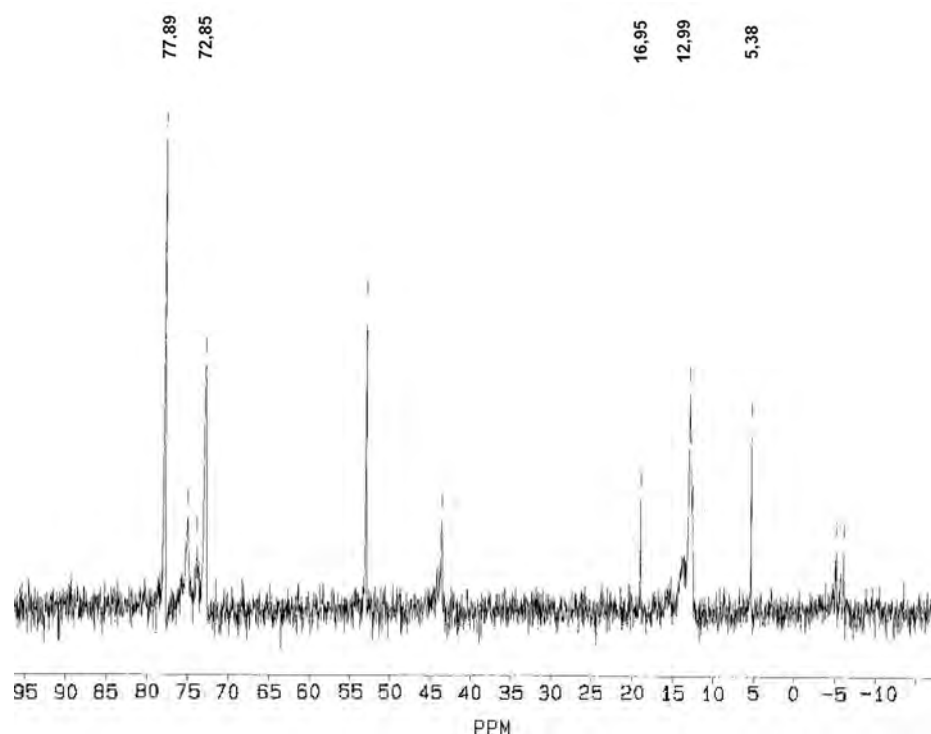


Figure 3-7 : Réaction de la substitution de la spermine-3-Boc sur un dendrimère de 1^{ère} génération au bout de 5 jours

Malgré l'échec du greffage complet de la spermine-3-Boc sur le dendrimère, ce résultat n'est pas sans intérêt dans la mesure où la possibilité d'effectuer la mono-substitution des groupements thiophosphine offre la possibilité de "décorer" la surface du dendrimère phosphoré avec deux types d'entités différents. En effet, il serait possible de substituer le premier atome de chlore du groupement thiophosphine par une molécule de spermine-3-Boc pour assurer la solubilité dans l'eau, puis le deuxième par un fluorophore, par exemple, pour la visualisation. Néanmoins, la réalisation d'un tel système dendritique nécessiterait une mise au point supplémentaire de synthèse qui pourrait prendre du temps. Nous nous sommes donc tournés vers une méthode plus classique pour créer un dendrimère fluorescent polycationique, en utilisant le greffage de molécules de N,N-diéthyléthylènediamine à la surface d'un dendrimère possédant un groupement maléimide fluorescent directement lié au cœur.

3.3 Dendrimère maléimide polycationique

3.3.1 Synthèse du dendrimère maléimide polycationique

Une série de dendrimères à extrémités chlore ou aldéhyde ayant un dérivé maléimide fluorescent directement lié au cœur a déjà été synthétisée et étudiée au sein de notre laboratoire²⁰. Il a été montré lors de ces études que la fluorescence de ce type de dendrimères n'est que très légèrement affectée par la présence d'eau. En revanche, la structure dendritique a un effet désactivateur sur l'intensité de fluorescence. Un dendrimère de très petite génération serait par conséquent plus convenable. Or il a également été montré que l'efficacité de transfection par les dendrimères polycationiques non fluorescents augmente avec la génération du dendrimère (de G1 à G4)⁴. Nous avons donc décidé de synthétiser un dendrimère polycationique de 2^{ème} génération possédant un 3,4-diphénylmaléimide directement lié au cœur pour des études préliminaires.

La synthèse de ce dendrimère polycationique maléimide fait intervenir la méthodologie du système AB₅, utilisée également pour la synthèse du dendrimère pérylène avec bras-espaceur dans le chapitre précédent (cf. Chapitre II). Le phénol maléimide **27** est obtenu par réaction de l'anhydride diphénylmaléique avec la tyramine (cf. Figure 3-8) dans l'acide acétique à 160°C^{20,21} et est isolé sous forme de poudre jaune avec un rendement de 95 %. Le phénol maléimide **27** est soluble dans la plupart des solvants organiques et est caractérisé en RMN ¹H par deux signaux triplet à 2,94 et 3,87 ppm (CDCl₃) correspondant aux CH₂ en et du groupement phénol. Ce phénol **27** est ensuite greffé sur le cœur triphosphazène penta-substitué **16** par la substitution nucléophile de l'atome de chlore restant dans le THF en présence du carbonate de césium (cf. Figure 3-9). La réaction est contrôlée en RMN ³¹P par la disparition du doublet à 5,2 ppm correspondant aux phosphores di-substitués et du doublet de doublet à 20,8 ppm correspondant au phosphore monosubstitué au profit d'un signal multiplet centré (dû au fait que les substituants ne sont pas équivalents) sur 8,3 ppm

²⁰ Franc G., Mazères S., Turrin C.O., Vendier L., Duhayon C., Caminade A.M., Majoral J.P. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 8707.

²¹ Thèse Grégory Franc **2007**

(C₆D₆). Le dendrimère maléimide **28** de génération 0 à extrémités aldéhyde est obtenu par chromatographie sur colonne à gel de silice sous forme de solide jaune avec un rendement de 85 %.

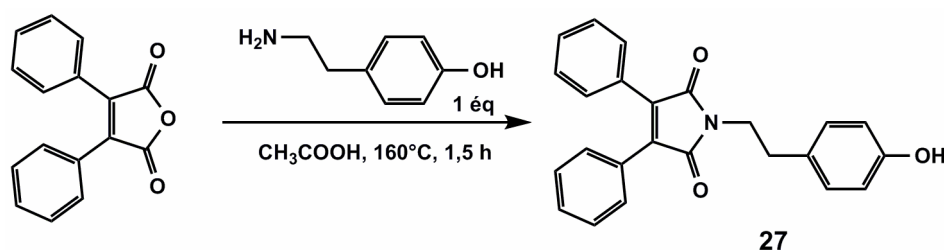


Figure 3-8 : Synthèse du phénol diphenylmaléimide

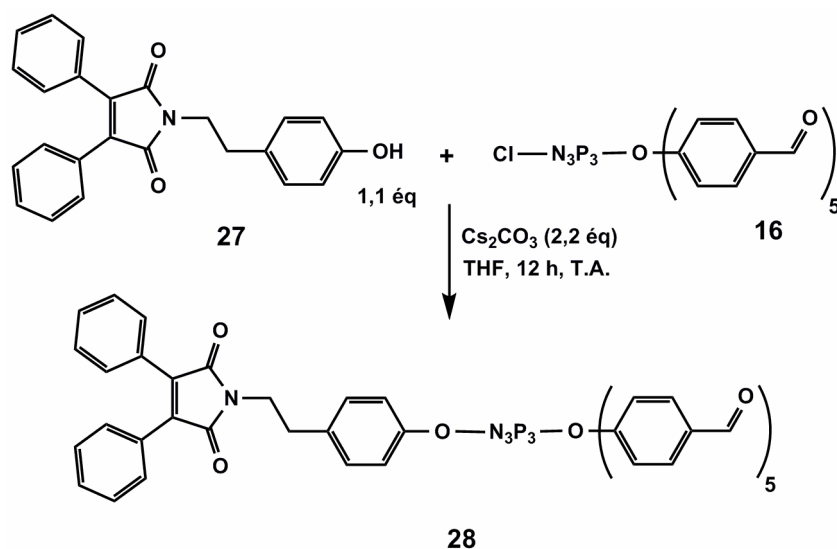


Figure 3-9 : Synthèse du dendrimère maléimide de génération 0 à extrémités aldéhyde

La condensation du phosphorylhydrazide sur les extrémités aldéhyde du dendrimère maléimide **28** dans le mélange THF/chloroforme (cf. Figure 3-10) donne le dendrimère maléimide de 1^{ère} génération **29** à extrémités chlore qui est caractérisé en RMN ¹H par l'absence du signal vers 10 ppm correspondant aux groupements aldéhyde et en RMN ³¹P par l'apparition d'un nouveau signal à 62,5 ppm correspondant aux phosphores de la périphérie. Ce dendrimère **29** possédant 10 extrémités chlore a ensuite été substitué par 10 équivalents de 4-hydroxybenzaldéhyde dans les conditions classiques de croissance dendritique (cf. Figure 3-10) pour donner le dendrimère maléimide **30** de 1^{ère} génération à extrémités aldéhyde qui est caractérisé en RMN ³¹P par le déplacement du signal correspondant aux atomes de phosphore de la périphérie de 62,5 ppm à 61 ppm (C₆D₆). Puis la condensation de ces extrémités

aldéhyde avec le phosphorhydrazide permet de donner le dendrimère maléimide **31** de 2^{ème} génération avec 20 extrémités chlore (cf. Figure 3-10). La disparition totale du signal correspondant aux groupements aldéhyde à 10 ppm en RMN ¹H et l'apparition d'un nouveau signal à 62,8 ppm, en RMN ³¹P, correspondant aux atomes de phosphore de la nouvelle périphérie indiquent l'obtention de ce dendrimère **31**.

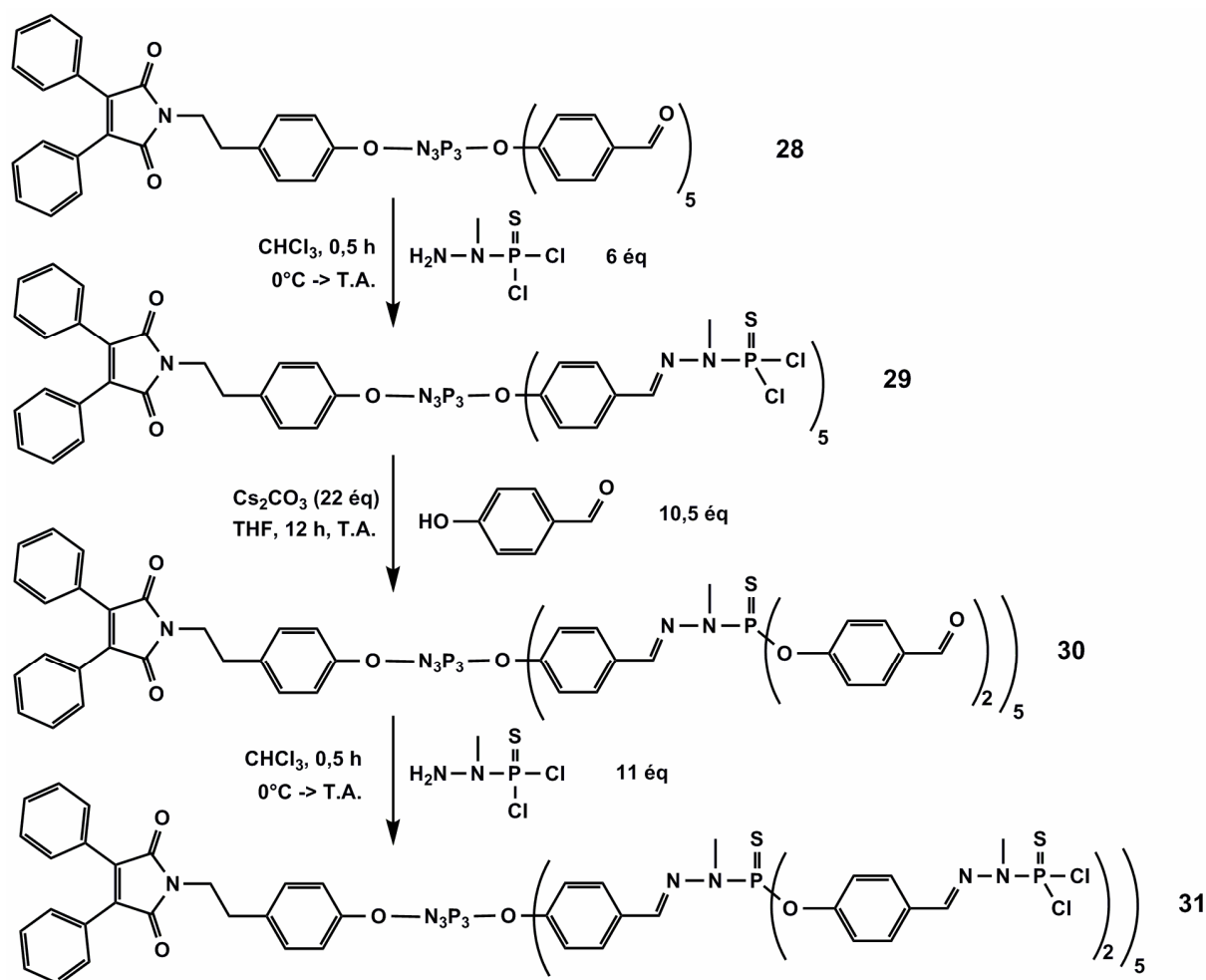


Figure 3-10 : Croissance dendritique du dendrimère maléimide jusqu'à la 2^{ème} génération

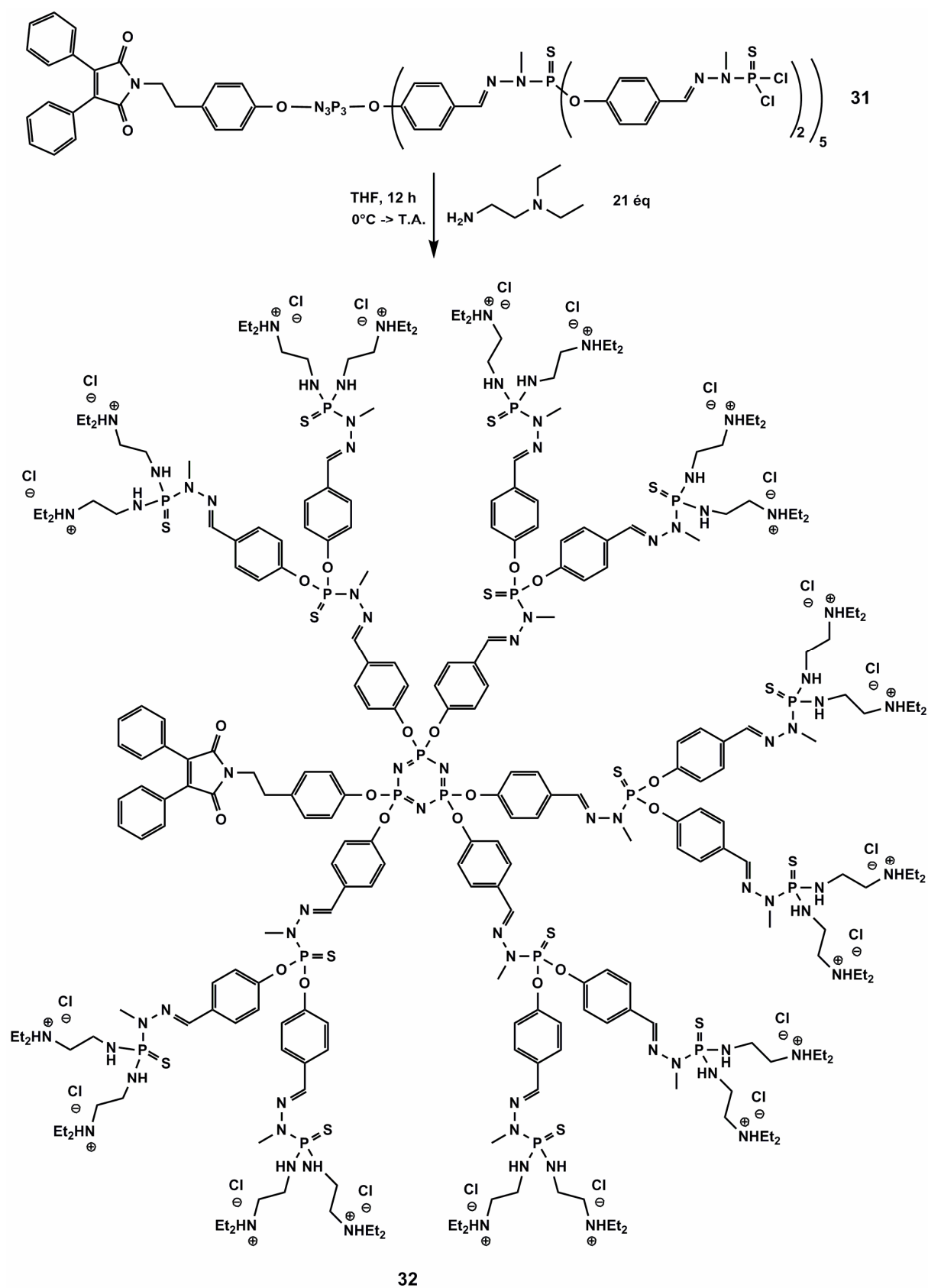


Figure 3-11 : Synthèse du dendrimère maléimide polycationique

La réaction de ce dendrimère maléimide **31** possédant 20 extrémités chlore avec 20 équivalents de N,N-diéthyléthylènediamine dans le THF permet de former le dendrimère maléimide polycationique **32** (cf. Figure 3-11). Le chlorure d'hydrogène généré par la réaction est piégé par les atomes d'azote terminaux, permettant ainsi de former des groupements ammonium qui induisent la solubilité de toute la structure dendritique dans l'eau. Ce dendrimère maléimide polycationique est caractérisé en RMN ^{31}P par la disparition du signal à 62,8 ppm correspondant aux groupements thiophosphine au profit d'un nouveau signal à 70,2 ppm correspondant aux atomes de phosphore di-substitués par la diamine. Les signaux correspondant à la structure interne restent inchangés.

3.3.2 Fluorescence et propriétés physico-chimiques

Etant donné que le dendrimère **32** est à la fois soluble dans l'eau et dans certains solvants organiques polaires tels que le dichlorométhane, les propriétés de fluorescence de ce dendrimère ont été étudiées dans ces deux types de solvants. Ces expériences ont été réalisées au département de Chimie Bioorganique du "centre of Molecular and Macromolecular studies" de l'Académie de Sciences en Pologne.

Dans le dichlorométhane, le dendrimère **32** présente une émission brillante vers 510 nm avec une excitation à 380 nm, tandis que dans l'eau MilliQ, l'intensité de fluorescence de ce dendrimère à la même concentration est extrêmement basse (cf. Figure 3-12). Il a été montré auparavant que la fluorescence du groupement maléimide n'est que très légèrement affectée par l'eau^{20,22}. Nous pensons par conséquent que cette réduction de fluorescence dans l'eau n'est pas due à une interaction directe de l'eau avec le maléimide mais à l'hydrophobicité de la structure interne du dendrimère. En effet, il a été montré dans des études précédentes qu'un dendrimère de 5^{ème} génération possédant les mêmes groupes ammonium terminaux se replie sur lui-même dans l'eau mais commence à "gonfler" lorsque le THF est ajouté²³. Par ailleurs, il est connu que les branches dendritiques sont capables de

²² Martinez-Ferrero E., Franc G., Mazères S., Turrin C.-O., Caminade A.-M., Majoral J.-P. and Sanchez C. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7658.

²³ Leclaire J., Coppel Y., Camindade A.-M. and Majoral J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2304.

désactiver la fluorescence du groupe maléimide²⁰, il est probable que cette proximité des branches due au repliement du dendrimère dans l'eau ait aggravé l'effet de désactivation de la fluorescence.

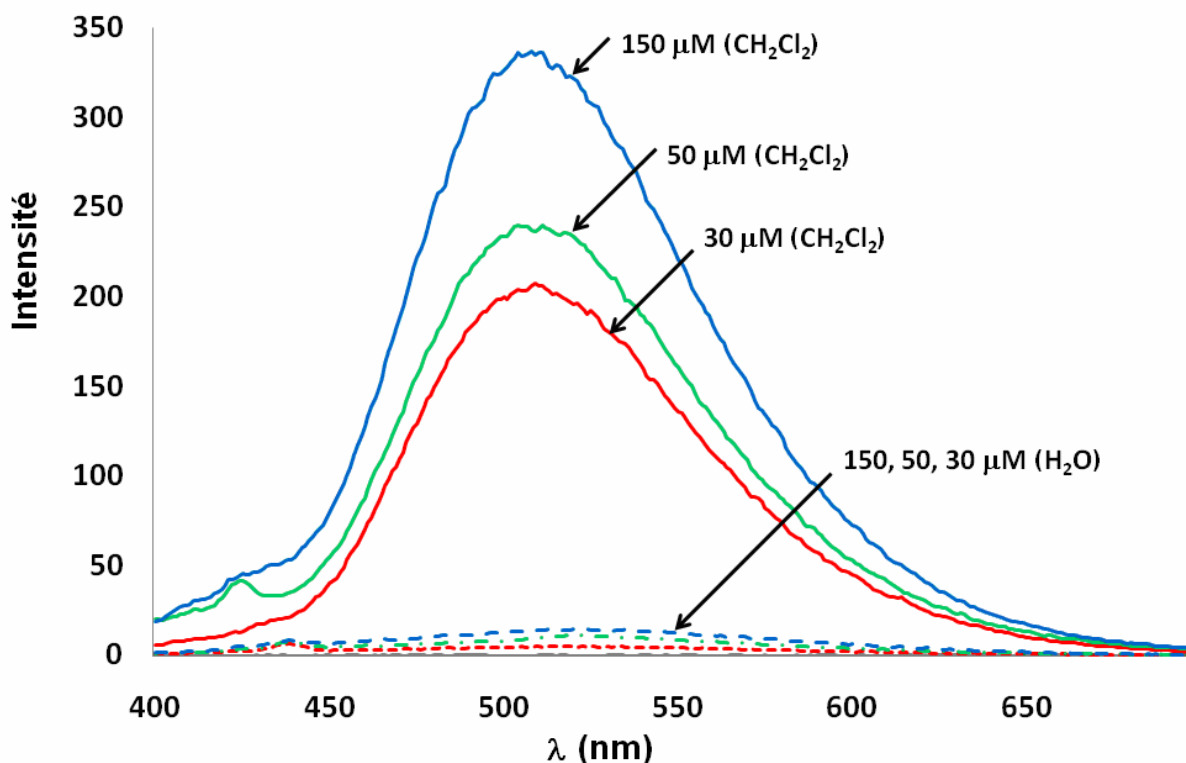


Figure 3-12 : Intensité relative de fluorescence du dendrimère 32 dans le CH_2Cl_2 (—) et dans l'eau MilliQ (----). Concentrations du dendrimère 32 dans les deux cas : 30, 50 et 150 μM

Néanmoins, la présence de certaines substances dans le milieu pourrait modifier le degré de repliement (comme le THF précédemment), et ainsi augmenter l'intensité de fluorescence. Afin de vérifier cette hypothèse, d'autres expériences ont été réalisées dans des conditions proches du milieu physiologique, à savoir le tampon phosphate (PBS), les milieux RPMI 1640 (milieu de culture fréquemment utilisé pour les cellules ou les tissus humains) contenant respectivement 10 % et 20 % de SVF (sérum du veau fœtal) ainsi que le milieu OPTI MEM (milieu idéal pour la transfection par des lipides cationiques²⁴). Il a été observé que l'intensité de fluorescence est légèrement plus importante dans le PBS et les milieux RPMI que dans l'eau pure, mais elle n'a été détectée dans le milieu OPTI MEM que pour des concentrations en dendrimère extrêmement basses (cf. Figure 3-13). Ce dernier phénomène

²⁴ <http://www.invitrogen.com>

n'est pas dû à des effets désactivateurs supplémentaires mais à la précipitation du dendrimère dans ce milieu. En effet, le résultat observé sous microscope optique (cf. Figure 3-14) montre que le dendrimère **32** est parfaitement soluble dans l'eau, même à 10 M, tandis que sa précipitation dans le milieu OPTI MEM commence quasiment immédiatement (dès 1 M). Le dendrimère **32** précipite également dans les milieux RPMI 1640, mais le phénomène n'est observé qu'au bout de 48 heures et uniquement dans les solutions de concentrations élevées.

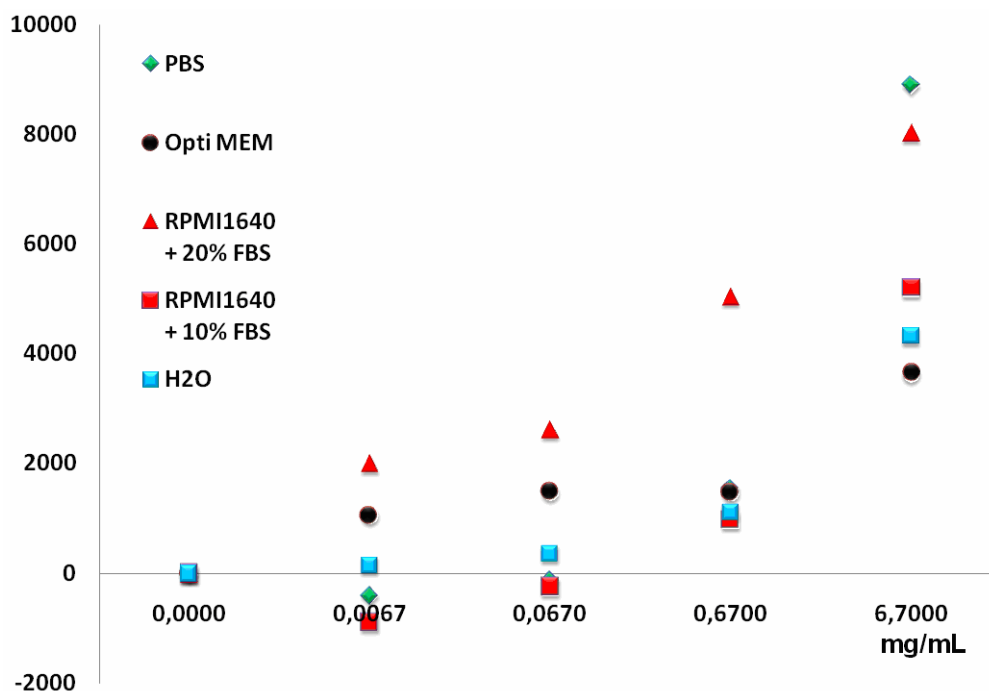


Figure 3-13 : Evolution de l'intensité de fluorescence du dendrimère 32 dans différents milieux (losanges verts : PBS ; disques noirs : Opti MEM ; carrés rouges : RPMI1640 + 10 % SVF ; triangles rouges : RPMI1640 + 20 % ; carrés bleus : eau MilliQ) et à différentes concentrations

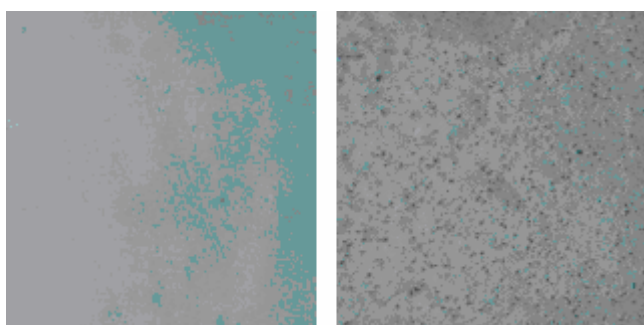


Figure 3-14 : Images (40x) du dendrimère 32 (concentration 1,0 M). Gauche : dans l'eau ; Droite : dans le milieu OPTI MEM.

3.3.3 *Propriétés biologiques*

3.3.3.1 Cytotoxicité du dendrimère maléimide polycationique

La cytotoxicité de ce dendrimère **32** a été étudiée dans le laboratoire avec lequel nous collaborons en Pologne, sur deux lignées cellulaires : les cellules HeLa (cellules humaines du cancer de l'utérus) et les cellules A549 (cellules humaines du cancer du poumon) en utilisant le test MTT (cf. Chapitre II). Pour chaque lignée cellulaire, deux contrôles ont été effectués, un sans dendrimère, l'autre sans dendrimère mais avec la lipofectine (un agent de transfection commun) présente à 10 μ g/mL. Le dendrimère **32** a été testé à plusieurs concentrations allant de 0,5 à 50 μ g/mL et à deux durées d'incubation différentes, 24 heures et 48 heures. Le résultat montre que le dendrimère est moins toxique pour les cellules HeLa que pour les cellules A549 et étonnamment moins toxique au bout de 48 heures qu'au bout de 24 heures (cf. Figure 3-15). Ceci laisse supposer que les cellules testées sont capables de métaboliser le dendrimère au cours des expériences et ainsi, après une durée d'incubation plus longue, moins d'agents toxiques sont présents dans le milieu, qui se traduit par une meilleure viabilité. D'après ces résultats, nous pouvons en déduire que le dendrimère **32** devrait être utilisé à des concentrations entre 1,0 et 10 μ g/mL et avec un temps d'incubation relativement court.

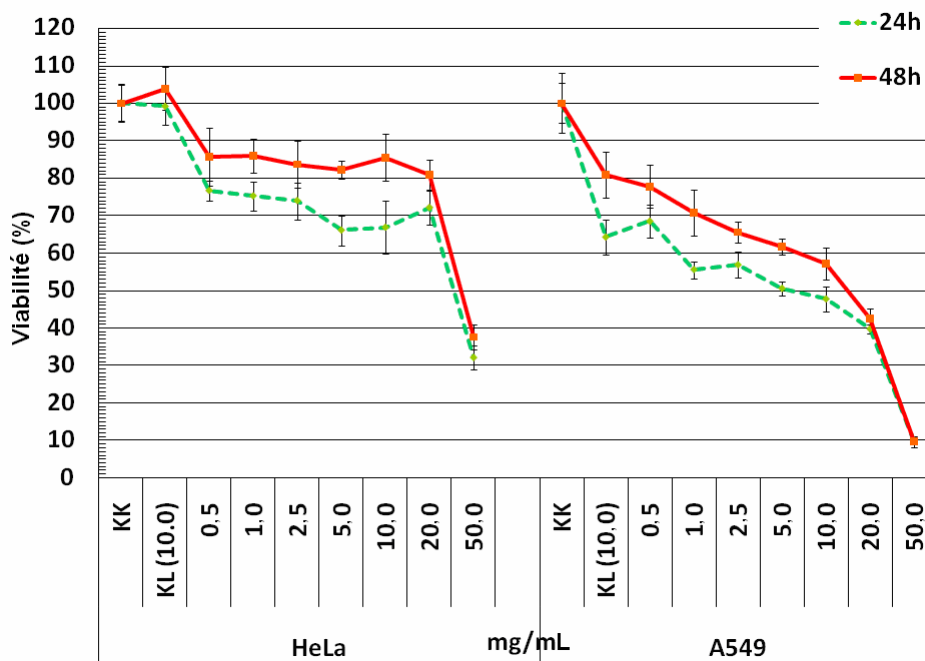


Figure 3-15 : Viabilité des cellules HeLa et des cellules A549 dans le milieu RPMI 1640 sans dendrimère et sans lipofectine (KK), avec la lipofectine (KL, 10 g/mL), avec différentes concentrations de dendrimère 32 (de 0,5 à 50 g/mL) après 24 heures (----) et après 48 heures (—)

3.3.3.2 Interactions supramoléculaires avec l'ADN plasmidique

Les études des interactions du dendrimère **32** avec l'ADN ont été réalisées avec l'ADN plasmidique codant pour le gène d'une protéine de fusion fluorescente verte BACE-GFP dans le milieu OPTI MEM. La structure de l'association a d'abord été évaluée par la technique de dichroïsme circulaire (CD). Un matériau est considéré comme actif en dichroïsme circulaire s'il absorbe différemment la lumière selon sa polarisation : circulaire droite ou circulaire gauche. La polarisation de toute onde lumineuse peut se décomposer en deux parties : l'une circulaire droite (PCD) et l'autre circulaire gauche (PCG). En présence de dichroïsme circulaire, l'une des deux composantes sera absorbée plus rapidement que l'autre. Cette propriété est souvent rencontrée dans les solutions du fait de la structure des molécules en solution. En fonction de la conformation que prennent les molécules, la lumière est absorbée différemment. Ainsi, cette technique de dichroïsme circulaire constitue sans doute l'une des méthodes les plus performantes pour étudier les modifications dans la structure secondaire de l'ADN induites en particulier par liaison avec des ligands. Les spectres de CD ont été

enregistrés dans la région de l'ultraviolet. Le résultat montre que l'activité CD intrinsèque du dendrimère est négligeable, tandis que l'ADN seul présente un spectre CD avec une bande positive vers 277 nm et une bande négative vers 243 nm (cf. Figure 3-16). Des effets de l'addition au fur et à mesure du dendrimère **32** à l'ADN (rapport groupes terminaux du dendrimère/bases de l'ADN de 2/1 à 8/1) ont clairement été observés sur le spectre CD. Un déplacement dans le rouge du point isoélliptique de 259 à 267 nm a été observé, ainsi qu'une diminution de l'intensité des bandes positive et négative après la complexation avec le dendrimère, qui serait due à une précipitation partielle du dendriplexe. Des changements similaires dans le spectre CD avaient également été observés pour l'ADN complexé avec les dendrimères PAMAM positivement chargés^{25,26} et avec les dendrimères PPI, ce qui indique une perturbation partielle de la structure en hélice de type B de l'ADN.

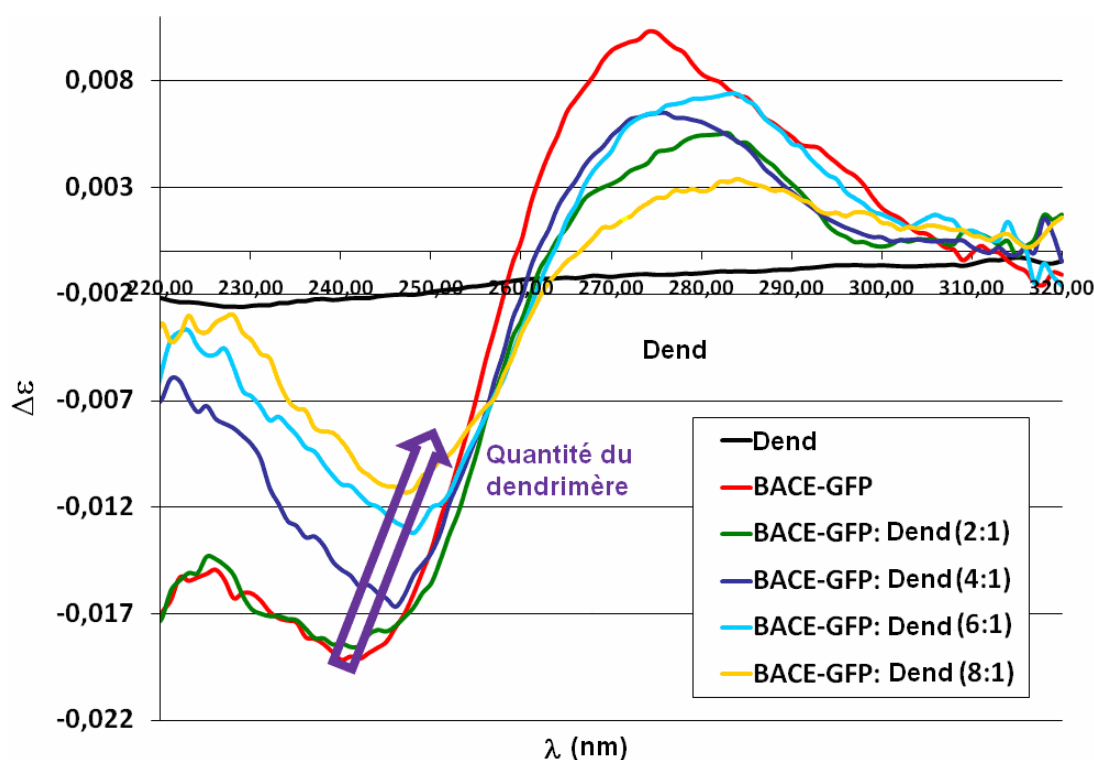


Figure 3-16 : Evolution des courbes CD de l'ADN en présence du dendrimère **32** (2-G2). (noire : dendrimère seul ; rouge : BACE-GFP seul ; vert : 2/1 ; bleu foncée : 4/1 ; bleu claire : 6/1 ; jaune : 8/1)

Une autre méthode de caractérisation de la complexation de l'ADN consiste à mesurer la force de l'association dendrimère/ADN par l'électrophorèse. Cette technique permet de

²⁵ Ottaviani M. F., Furini F., Casini A., Turro N. J., Jockusch S., Tomalia D. A. and Messori L. *Macromolecules* **2000**, 33, 7842.

²⁶ Mitra A. and Imae T. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 69.

séparer les différentes espèces sur un gel, en fonction de leur charge et de leur masse moléculaire : l'ADN seul (chargé négativement) devrait migrer vers l'anode plus vite que l'ADN complexé au dendrimère positivement chargé, puisque la plupart des charges négatives sont neutralisées dans ce complexe supramoléculaire. Les résultats ont été obtenus avec deux types de plasmides (BACE-GFP et HygEGFP qui est le gène codant pour une protéine de fusion de la résistance à l'hygromycine et de la GFP), dans deux types de milieux (OPTI MEM et RPMI 1640), et pour des rapports groupes terminaux du dendrimère/anions du plasmide différents (4/1, 6/1, 8/1) (cf. Figure 3-17). Il a été calculé que les charges négatives d'un microgramme d'ADN sont équivalentes aux charges positives d'un microgramme de dendrimère. Dans le cas du plasmide BACE-GFP, seul le dendriplexe de rapport 8/1 masque efficacement des charges négatives dans le milieu OPTI MEM, tandis que le dendriplexe de rapport 4/1 est suffisant dans le milieu RPMI 1640. Dans le cas du plasmide HygEGFP, même le dendriplexe de rapport 8/1 n'est pas suffisant dans le milieu OPTI MEM tandis que tous les dendriplexes masquent les charges dans le milieu RPMI 1640. Ces résultats sont en fait corrélés avec la solubilité du dendrimère seul dans le milieu (cf. Figure 3-14), les dendrimères précipités ne peuvent pas s'associer à l'ADN pour former un dendriplexe.

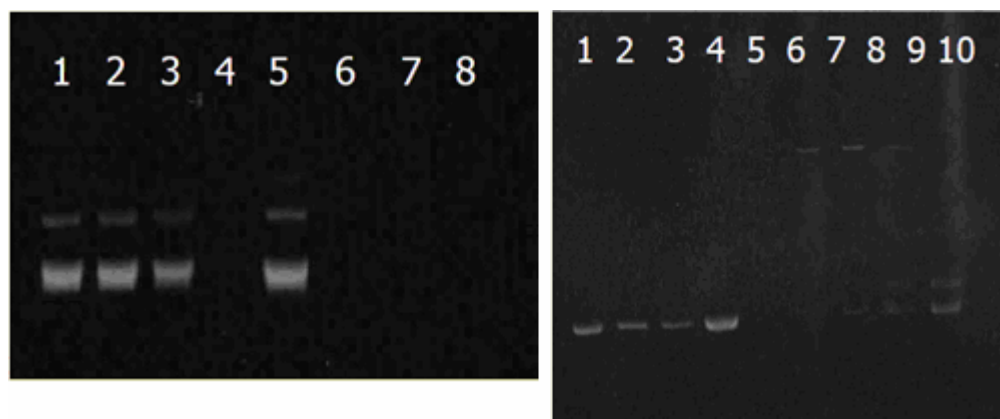


Figure 3-17 : Expériences d'électrophorèse. Gauche : plasmide BACE-GFP (piste 1 : BACE-GFP seul dans le milieu OPTI MEM ; pistes 2-4 : complexes plasmide/dendrimère 32 à des rapports 4/1, 6/1, 8/1 (groupes terminaux du dendrimère/bases du plasmide BACE-GFP) respectivement, dans le milieu OPTI MEM ; piste 5 : BACE-GFP seul dans le milieu RPMI 1640 ; pistes 6-8 : complexes plasmide/dendrimère 32 à des rapports 4/1, 6/1, 8/1 (groupes terminaux du dendrimère/bases du plasmide BACE-GFP) respectivement, dans le milieu RPMI 1640). Droite : plasmide HygEGFP (pistes 1-3 : complexes plasmide/dendrimère 32 à des rapports 4/1, 6/1, 8/1 (groupes terminaux du dendrimère/bases du plasmide HygEGFP) respectivement, dans le milieu OPTI MEM ; piste 4 : HygEGFP seul dans le milieu OPTI

MEM ; piste 5 : dendrimère 32 seul dans le milieu OPTI MEM ; pistes 6-8 : complexes plasmide/dendrimère 32 à des rapports 4/1, 6/1, 8/1 (groupes terminaux du dendrimère/bases du plasmide HygEGFP) respectivement, dans le milieu RPMI 1640 ; piste 9 : HygEGFP seul dans le milieu RPMI 1640 ; piste 10 : dendrimère 32 seul dans le milieu RPMI 1640)

3.4 Conclusion

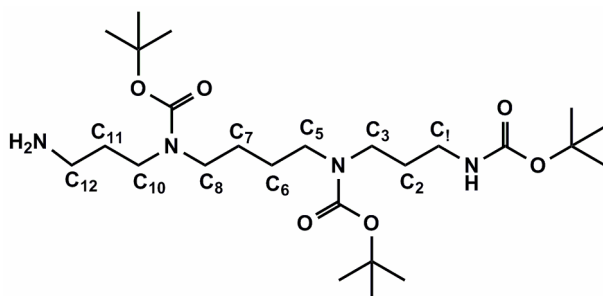
Afin d'augmenter la solubilité dans l'eau des dendrimères phosphorés polycationiques pour une meilleure performance en transfection, il a été envisagé de greffer des molécules de spermine à la surface du dendrimère. Pour ce faire, la spermine qui possède 2 amines primaires et 2 amines secondaires de manière symétrique a subi plusieurs étapes de protection/déprotection afin de posséder uniquement une amine primaire libre pour son greffage sur le dendrimère. Néanmoins, cette spermine-3-Boc n'a pas pu être greffée sur le dendrimère de 1^{ère} génération de manière complète car la prolongation de la réaction substitution nucléophile en vue d'un greffage complet provoque la dégradation du dendrimère.

Un outil dendritique possédant un fluorophore maléimide directement lié au cœur et des charges positives à la surface pour la solubilité dans l'eau et l'interaction avec l'ADN a pu être synthétisé selon une méthode plus classique. Les mesures de l'intensité de fluorescence de ce dendrimère dans le dichlorométhane donnent de très bons résultats, tandis que les mesures réalisées dans différents milieux aqueux ne montrent que des intensités de fluorescence extrêmement faibles, à cause de l'hydrophobie de la structure interne du dendrimère et de l'inhibition de la fluorescence du maléimide par les branches dendritiques. La cytotoxicité de ce dendrimère mesurée sur deux lignées cellulaires cancéreuses (HeLa et A549) indique une tolérance relativement bonne de ces cellules après 24 heures d'incubation (jusqu'à 10 g/mL) et une diminution de cytotoxicité surprenante après 48 heures d'incubation. Ces études préliminaires ont permis de déterminer la gamme de concentrations utilisables pour les études d'interaction de ce dendrimère avec l'ADN. La technique de dichroïsme circulaire appliquée à l'interaction dendrimère/ADN plasmidique indique une perturbation partielle de l'hélice B de la structure de l'ADN, et les expériences d'électrophorèse ont confirmé cette interaction et par conséquent la formation d'un

dendriplexe dans plusieurs cas testés. Ces résultats préliminaires montrent que cet outil dendritique est potentiellement intéressant pour les expériences de transfection, mais sa faible intensité de fluorescence prouve qu'il ne convient certainement pas à la visualisation des événements biologiques associés à la transfection. Il serait intéressant de remplacer le groupement maléimide par un fluorophore plus intense et de construire un dendrimère de plus haute génération (densité de charge plus élevée) afin d'améliorer l'efficacité de transfection ainsi que le contrôle visuel.

3.5 Partie expérimentale

Composé 25 : Spermine-3-Boc^{18,19}



A une solution de spermine (0,97 g, 4,75 mmol) dans le méthanol anhydre (15 mL) refroidie à -78°C à l'aide d'un bain de mélange acétate d'éthyle/azote liquide, a été ajouté goutte à goutte le trifluoroacétate d'éthyle (0,6 mL, 4,9 mmol). Le mélange réactionnel est laissé agiter une heure à -78°C puis 30 min de plus à 0°C . A ce mélange réactionnel à 0°C , a été ensuite ajoutée goutte à goutte une solution de di-*tert*-butyldicarbonate (4,3 g, 19,6 mmol) dans le méthanol anhydre (10 mL) pendant une heure puis le mélange réactionnel est laissé agiter pendant 15 heures supplémentaires à température ambiante. Sans isoler le produit, a été additionnée l'ammoniaque jusqu'à ce que le pH du mélange réactionnel atteigne une valeur de 11 et le mélange réactionnel est laissé agiter de nouveau pendant 15 heures à température ambiante avant d'être évaporé. Le produit brut a été purifié par extraction au dichlorométhane (x 3) puis les phases organiques ont été regroupées, séchées sur sulfate de sodium et évaporées. Le produit brut obtenu a ensuite été purifié par chromatographie sur colonne de

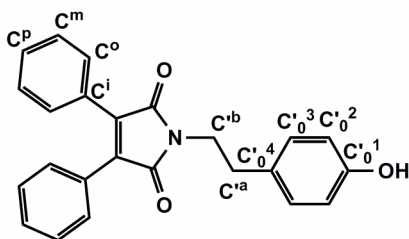
silice en utilisant le mélange Acétate d'éthyle/Méthanol (3/2, v/v) comme éluant pour donner la spermine-3-Boc **25** sous forme d'huile jaune visqueuse (57 %).

RMN ^1H (CDCl_3 , 250,1 MHz): = 1,41 (sl, 31H, $\text{C}_6\text{-H}_2$, $\text{C}_7\text{-H}_2$, CH_3), 1,61 (sl, 6H, $\text{C}_2\text{-H}_2$, $\text{C}_{11}\text{-H}_2$, NH_2), 2,65 (t, $J = 7$ Hz, 2H; $\text{C}_{12}\text{-H}_2$), 3,05 – 3,38 (m, 10H, $\text{C}_1\text{-H}_2$, $\text{C}_3\text{-H}_2$, $\text{C}_5\text{-H}_2$, $\text{C}_8\text{-H}_2$, $\text{C}_{10}\text{-H}_2$) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 62,9 MHz): = 25,91 (sl, C_6 , C_7), 28,40 (s, CH_3 , C_2), 31,84, 32,56 (2s, C_{11}), 37,41 (s, C_1), 39,16 (s, C_{12}), 43,93 (sl, C_3 , C_{10}), 46,63 (sl, C_5 , C_8), 78,88, 79,28, 79,49 (m, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 155,61, 156,00 (m, C=O) ppm.

SM-IC : 503,6 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Composé **27** :

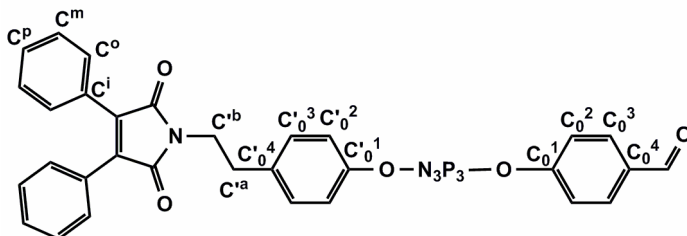


L'anhydride 3,4-diphénylmaléique (1 g, 4 mmol) et la tyramine (0,55 g, 4 mmol) ont été mélangés avec un minimum d'acide acétique. Le mélange réactionnel est chauffé à 160°C pendant 1,5 heures pour donner une huile visqueuse. Le mélange réactionnel est refroidi à température ambiante et 50 mL d'eau distillée ont été ajoutées. Le précipité jaune formé est filtré et purifié par chromatographie sur colonne à gel de silice en utilisant dichlorométhane/pentane comme éluant pour donner le composé **27** sous forme de poudre jaune avec un rendement de 95 %.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400,1 MHz) : = 2,94 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,5$ Hz, 2H, $\text{C}'^a\text{-H}$), 3,87 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,5$ Hz, 2H, $\text{C}'^b\text{-H}$), 5,65 (s, 1H, OH), 6,79 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 2H, $\text{C}'^0\text{}^2$), 7,13 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 2H, $\text{C}'^0\text{}^3$), 7,27-7,45 (m, 10H, $\text{C}^o\text{-H}$, $\text{C}^m\text{-H}$, $\text{C}^p\text{-H}$) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 125,8 MHz) : = 34,17 (s, C'^{a}), 40,31 (s, C'^{b}), 115,84 (s, $\text{C}'_0{}^2$), 128,96 (s, C^{i}), 129,00 (s, C^{m}), 130,26 (s, C^{o}), 130,28 (s, C^{p}), 130,48 (s, $\text{C}'_0{}^3$), 130,51 (s, $\text{C}'_0{}^4$), 136,54 (s, C=C), 154,77 (s, $\text{C}'_0{}^1$), 171,15 (s, C=O) ppm.

Composé 28 :

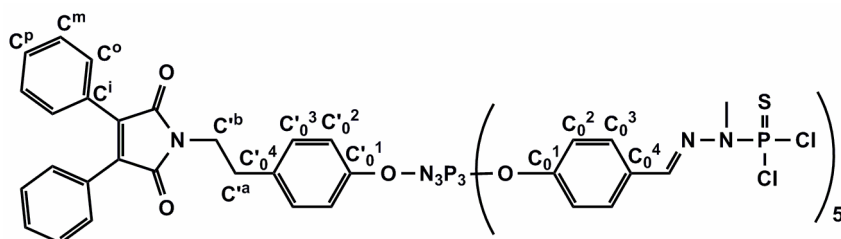


A une solution de composé **27** (370 mg, 1 mmol) et de dendrimère AB_5 (780 mg, 1 mmol) dans le THF distillé (5 mL), a été ajouté le carbonate de césium (656 mg, 1 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 12 heures puis centrifugé pour enlever le sel formé, et évaporé à sec. Le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne à gel de silice pour donner le dendrimère **28** sous forme d'un solide jaune avec un rendement de 85 %.

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz) : = 8,04 (m, N_3P_3) ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 500,3 MHz) : = 3,03 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,5$ Hz, 2H, C'^{a} -H), 3,88 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,5$ Hz, 2H, C'^{b} -H), 7,06 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 2H, $\text{C}'_0{}^2$), 7,24 – 7,29 (m, 12H, $\text{C}_0{}^2$, $\text{C}'_0{}^3$), 7,35-7,46 (m, 10H, C^{o} -H, C^{m} -H, C^{p} -H), 7,81 – 7,89 (m, 10H, $\text{C}_0{}^3$), 9,98 (s, 5H, CHO) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 125,8 MHz) : = 33,44 (s, C'^{a}), 39,19 (s, C'^{b}), 120,77 (s, $\text{C}'_0{}^2$), 121,31 (m, $\text{C}_0{}^2$), 128,32 (s, C^{o}), 129,10 (s, C^{i}), 129,56 (s, C^{p}), 129,81 (s, C^{m}), 130,21 (s, $\text{C}'_0{}^3$), 131,21, 131,24, 131,26 (3s, $\text{C}_0{}^3$), 134,06, 134,15, 134,17 (3s, $\text{C}_0{}^4$), 136,30 (s, $\text{C}'_0{}^4$), 136,42 (s, C=C), 148,83 (m, $\text{C}'_0{}^1$), 154,64 (s, $\text{C}_0{}^1$), 170,30 (s, C=O), 190,49 (s, CHO), 190,55 (s, CHO) ppm.

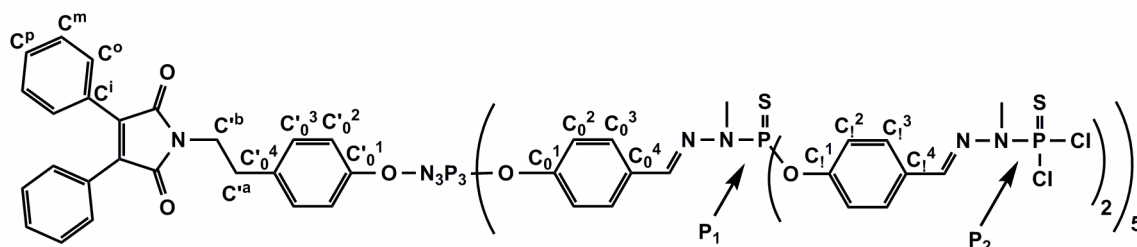
Composé 29 :

A une solution de composé **28** (140 mg, 0,13 mmol) dans le THF distillé (4 mL) a été ajoutée le phosphorhydrazide à 0,24 M dans le chloroforme (3,2 mL, 0,76 mmol) à 0°C. Le mélange réactionnel est laissé agiter pendant 30 minutes avant d'être concentré et purifié par la technique de lavage/précipitation dans le mélange pentane/éther diéthylique. Le produit **29** est obtenu sous forme de poudre jaune avec un rendement de 91 %.

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz) : = 8,52 (m, N_3P_3), 62,50 (s, P=S) ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 500,3 MHz) : = 2,95 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,5$ Hz, 2H, C'^{a} -H), 3,45 (d, $^3J_{\text{HP}} = 13,9$ Hz, 6H, $\text{CH}_3\text{-N-P}$), 3,48 (d, $^3J_{\text{HP}} = 13,8$ Hz, 9H, $\text{CH}_3\text{-N-P}$), 3,80 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,5$ Hz, 2H, C'^{b} -H), 6,92 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 2H, C'^{o^2}), 6,98 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,7$ Hz, 4H, $\text{C}_0^2\text{-H}$), 7,07 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,7$ Hz, 6H, $\text{C}_0^2\text{-H}$), 7,08 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,3$ Hz, 2H, $\text{C}'^{\text{o}^3}\text{-H}$), 7,35-7,48 (m, 10H, C^{o} -H, C^{m} -H, C^{p} -H), 7,60 ($^3J_{\text{HH}} = 8,7$ Hz, 4H, $\text{C}_0^3\text{-H}$), 7,62 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,7$ Hz, 6H, $\text{C}_0^3\text{-H}$), 7,65 (s, 3H, CH=N), 7,68 (s, 2H, CH=N) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 125,8 MHz) : = 31,91 (d, $^3J_{\text{CP}} = 12,3$ Hz, $\text{CH}_3\text{-N-P}$), 32,01 (d, $^3J_{\text{CP}} = 12,6$ Hz, $\text{CH}_3\text{-N-P}$), 33,98 (s, C'^{a}), 39,36 (s, C'^{b}), 121,17 (sl, C'^{o^2}), 121,34 (sl, C_0^2), 121,43 (sl, C_0^2), 128,46 (s, C^{i}), 128,64 (s, C_0^3 , C^{m}), 129,87 (s, C^{p} , C'^{o^3}), 129,98 (s, C^{o}), 131,18 (s, C_0^4), 131,27 (s, C_0^4), 131,31 (s, C_0^4), 135,13 (s, C'^{o^4}), 136,25 (s, C=C), 140,67, 140,74 (2d, $^3J_{\text{CP}} = 17,6$ Hz, CH=N), 148,83 (sl, C'^{o^1}), 154,67 (sl, C_0^1), 151,77 (sl, C_0^1), 151,82 (sl, C_0^1), 170,60 (s, C=O) ppm.

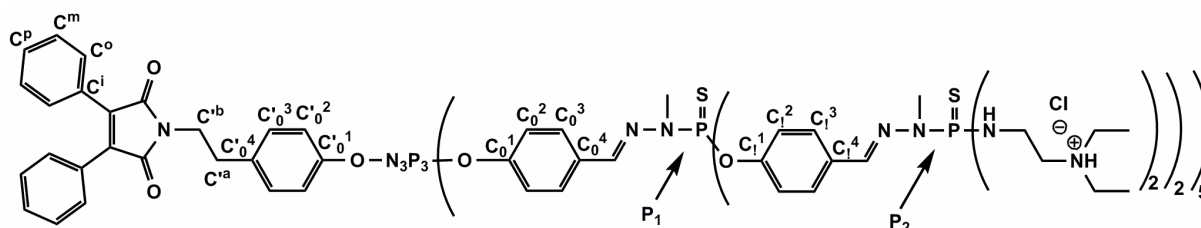
Composé 31 :

A une solution de dendrimer **30** (166 mg, 0,06 mmol) dans le THF distillé (4 mL), a été ajouté le phosphorhydrazide à 0,24 M dans le chloroforme (0,75 mL, 0,66 mmol) à 0°C. Le mélange réactionnel est laissé agiter pendant 30 minutes à température ambiante avant d'être évaporé et précipité dans le mélange pentane/éther diéthylique. Cette étape de lavage est répétée une fois pour donner le dendrimer **31** sous forme de poudre jaune avec un rendement de 90 %.

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz) : = 8,35 (m, N_3P_3), 61,95 (s, $\text{P}_1=\text{S}$), 61,99 (s, $\text{P}_1=\text{S}$), 62,80 (s, $\text{P}_2=\text{S}$), 62,83 (s, $\text{P}_2=\text{S}$) ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz) : = 2,89 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 2H, $\text{C}'^{\text{a}}\text{-H}$), 3,32 (m, 15H, $\text{CH}_3\text{-N-P}_1$), 3,43 (d, $^3J_{\text{HP}} = 13,8$ Hz, 12H, $\text{CH}_3\text{-N-P}_2$), 3,44 (d, $^3J_{\text{HP}} = 13,8$ Hz, 18H, $\text{CH}_3\text{-N-P}_2$), 3,76 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 2H, $\text{C}'^{\text{b}}\text{-H}$), 6,92 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 2H, $\text{C}'_0{}^2\text{-H}$), 7,00 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 4H, $\text{C}_0{}^2\text{-H}$), 6,98 – 7,08 (m, 8H, $\text{C}'_0{}^3\text{-H}$, $\text{C}_0{}^2\text{-H}$), 7,22 – 7,28 (m, 20H, $\text{C}_1{}^2\text{-H}$), 7,30 – 7,43 (m, 10H, $\text{C}^{\text{o}}\text{-H}$, $\text{C}^{\text{m}}\text{-H}$, $\text{C}^{\text{p}}\text{-H}$), 7,55 – 7,71 (m, 45H, $\text{C}_0{}^3\text{-H}$, $\text{C}_1{}^3\text{-H}$, CH=N) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz) : = 31,90 (d, $^3J_{\text{CP}} = 13,1$ Hz, $\text{CH}_3\text{-N-P}_1$), 33,07 (d, $^3J_{\text{CP}} = 12,5$ Hz, $\text{CH}_3\text{-N-P}_2$), 33,93 (s, C'^{a}), 39,35 (s, C'^{b}), 121,09 (sl, $\text{C}'_0{}^2$), 121,40 (sl, $\text{C}_0{}^2$), 121,86 (sl, $\text{C}_1{}^2$), 128,30 (s, $\text{C}_0{}^3$), 128,44 (s, C^{i}), 128,62 (s, C^{m}), 128,75 (sl, $\text{C}_1{}^3$), 129,83 (s, C^{o} , C^{p}), 129,99 (s, $\text{C}'_0{}^3$), 131,60 (s, $\text{C}_1{}^4$), 131,89 (s, $\text{C}_0{}^4$), 131,97 (s, $\text{C}_0{}^4$), 135,15 (s, $\text{C}'_0{}^4$), 136,13 (s, C=C), 139,03 (d, $^3J_{\text{CP}} = 13,6$ Hz, CH=N-N-P_1), 140,61 (d, $^3J_{\text{CP}} = 18,8$ Hz, CH=N-N-P_2), 149,03 (sl, $\text{C}'_0{}^1$), 151,37 (sl, $\text{C}_0{}^1$), 151,82 (m, $\text{C}_1{}^1$), 170,46 (s, C=O) ppm.

Composé **32** :

A une solution de dendrimère **31** (235 mg, 53,8 μ mol) dans le THF distillé (35 mL), a été ajouté goutte à goutte la N,N-diéthyléthylènediamine (160 μ L, 1,13 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 12 heures. Le solvant est éliminé par filtration et le produit brut est lavé avec le THF (x2) pour donner le dendrimère **32** sous forme de poudre jaune avec un rendement de 92 %.

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CD_3OD , 121,5 MHz) : δ = 9,14 (m, N_3P_3), 62,45 (s, $\text{P}_1=\text{S}$), 62,65 (s, $\text{P}_1=\text{S}$), 70,21 (s, $\text{P}_2=\text{S}$), 62,83 ppm.

RMN ^1H (CD_3OD , 300,1 MHz) : δ = 1,30 (m, 120H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 2,90 (m, 2H, $\text{C}'^{\text{a}}\text{-H}$), 3,05 - 3,50 (m, 207H, $\text{CH}_3\text{-N-P}_1$, $\text{CH}_3\text{-N-P}_2$, CH_2 , $\text{C}'^{\text{b}}\text{-H}$), 6,80- 7,10 (m, 14H, $\text{C}'^{\text{0}^2}\text{-H}$, $\text{C}_0^2\text{-H}$, $\text{C}'^{\text{0}^3}\text{-H}$), 7,24 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz, 20H, $\text{C}_1^2\text{-H}$), 7,30 - 7,45 (s, 10H, $\text{C}^{\text{o}}\text{-H}$, $\text{C}^{\text{m}}\text{-H}$, $\text{C}^{\text{p}}\text{-H}$), 7,50 - 7,90 (m, 45H, $\text{C}_0^3\text{-H}$, $\text{C}_1^3\text{-H}$, CH=N) ppm.

Chapitre

4

Dendrimères-PEG hydrosolubles

Table des matières

4.1	Introduction	162
4.2	Mise au point de la synthèse du dendrimère-PEG	162
4.2.1	Polyéthylène glycol : excellent élément en pharmacologie	162
4.2.2	Utilisation d'un PEG amine.....	165
4.2.3	Modification du monométhoxy PEG	168
4.2.4	Mise au point de la synthèse du dendrimère PEG via un PEG phénol	172
4.3	Propriétés physique et biologique	178
4.3.1	Expériences de diffusion en RMN	178
4.3.2	Cytotoxicité du dendrimère-PEG.....	181
4.4	Conclusion	182
4.5	Partie expérimentale	183

4.1 Introduction

La solubilité dans l'eau est une propriété indispensable pour les applications biologiques des dendrimères. La méthode générale pour rendre les macromolécules notamment les dendrimères hydrophobes solubles dans l'eau est d'y greffer des motifs hydrophiles, chargés ou neutres. Les dendrimères hydrosolubles polycationiques ont déjà été étudiés dans le chapitre III. L'effort porte désormais sur le développement des dendrimères hydrosolubles neutres pour l'imagerie *in vivo* ainsi que pour la délivrance des médicaments. Au cours de cette thèse, un dendrimère PEG de 1^{ère} génération a été obtenu et a montré des propriétés comportementales intéressantes. De plus, des tests de cytotoxicité ont montré que ce dendrimère PEG ne présente pas de toxicité vis-à-vis des cellules B16H10 étudiées, ce qui rend cette approche particulièrement prometteuse pour la fonctionnalisation des dendrimères phosphorés destinés à des applications en milieux aqueux : la biotechnologie, la catalyse dans l'eau.

4.2 Mise au point de la synthèse du dendrimère-PEG

4.2.1 Polyéthylène glycol : excellent élément en pharmacologie

Le polyéthylène glycol (PEG) est un polyéther composé des unités répétées d'oxyde d'éthylène $-(CH_2-CH_2-O)_n-$ et ayant une masse moléculaire inférieure à 20.000 g/mol¹. Au-delà de cette masse moléculaire, ce polymère est souvent appelé le PEO pour le polyéthylène oxyde. Le PEG est un polymère non chargé, hydrophile et soluble à la fois dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques (THF, DMF, alcools, solvants chlorés...). Il n'est quasiment pas toxique, ni immunogène, ce qui le rend particulièrement convenable pour des applications biologiques^{2,3,4,5}.

¹ Gajbhiye V., Kumar P. V., Kuamr Tekade R. and Jain N. K. *Current Pharmaceutical Design* **2007**, 13, 415.

² Wattendorf U. and Merkle H. P. *J. Pharm. Sci.* **2008**, 97, 4655.

³ Harris J. M., Zalipsky S., editors. *ACS Symp Ser* **2004**, 680.

⁴ Bentley M. D., Bossard M. J., Buron K. W. Viegas T. X. *Mod. Biopharm.* **2005**, 4, 1393.

⁵ Harris J. M. and Chess R. B. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2003**, 2, 214.

La solubilité du PEG dans l'eau n'est pas commune, étant donné que les deux structures qui lui sont très similaires, le polyméthylène glycol et le polypropylène glycol sont insolubles dans l'eau. Ceci est dû à la conformation gauche⁶ que le PEG est capable de prendre dans l'eau. Cette conformation offre deux accepteurs de liaison hydrogène à une distance idéale pour l'établissement des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau² (cf. Figure 4-1).

La conjugaison des macromolécules au PEG, plus couramment appelée la PEGylation, est en plein essor depuis une vingtaine d'années dans le domaine de la pharmacologie, car elle permet de modifier les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de certains agents thérapeutiques très prometteurs tels que les peptides activateurs ou inhibiteurs des mécanismes biologiques⁷ et d'augmenter leur potentiel thérapeutique. La PEGylation des principes actifs permet d'augmenter la rétention de ces médicaments dans la circulation sanguine en les protégeant contre la digestion enzymatique, de ralentir leur filtration par le rein et de réduire les réponses immunologiques impliquant la production des anticorps neutralisants⁸. Le premier médicament PEGylé approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) est une adénosine désaminase PEGylée, commercialisée sous le nom de Adagen[®] en 1990 pour traiter la maladie d'immunodéficience combinée sévère (SCID pour Severe Combined ImmunoDeficiency en anglais). L'injection intramusculaire de ce médicament 2 fois par semaine a remplacé de multiples transfusions sanguines, évitant ainsi les risques d'infection virale et offrant une nette amélioration dans le confort des patients. Depuis, d'autres médicaments PEGylés ont été commercialisés pour traiter des maladies comme la leucémie^{9,10}, l'hépatite C^{11,12} ou la neutropénie^{13,14,15}. Actuellement, de plus en plus

⁶ Bjorling M., Karlstrom G. and Linse P. *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 6706.

⁷ Veronese F. M. and Mero A. *Biodrugs* **2008**, 22, 315.

⁸ Fichburn C. S. *J. Pharm. Sci.* **2008**, 97, 4167.

⁹ Graham L. M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, 10, 1293.

¹⁰ Hak L. J., Relling M. V., Cheng C. Pei D., Wang B., Sandlund J.T., Rubnitz J. and Pui C.-H. *Leukemia* **2004**, 18, 1072.

¹¹ Wang Y. S., Youngster S., Grace M., Bausch J., Bordens R. and Wyss D. F. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, 547.

¹² Monkarsh S. P., Ma Y., Aglione A. Bailon P., Ciolek D., Debarbieri B., Graves M. C., Hollfelder K., Michel H., Palleroni A., Porter J. E., Russoman E., Roy S. and Pan Y.-C. *E. Anal. Biochem.* **1997**, 247, 434.

de composés PEGylés sont en cours de développement clinique, ce qui reflète l'importance de cette stratégie dans l'amélioration des médicaments macromoléculaires.

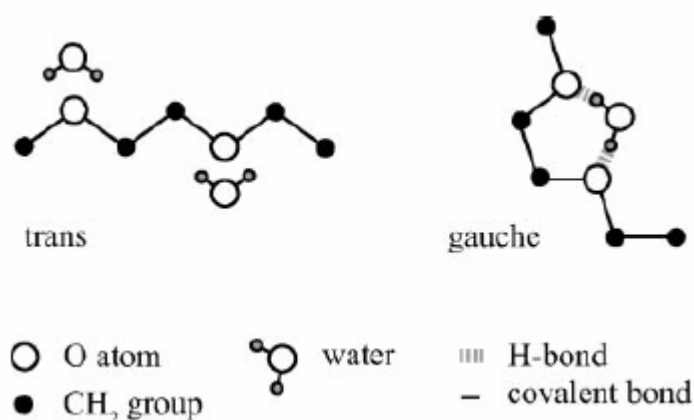


Figure 4-1 : Conformation trans et gauche du PEG et leur implication dans la formation des liaisons hydrogène dans l'eau²

La PEGylation des médicaments est possible grâce à la présence des deux fonctions hydroxyle qui peuvent être modifiées chimiquement afin d'attacher différents systèmes : des enzymes, des interférons, ou encore des nanoparticules et des dendrimères. Ces fonctions hydroxyle peuvent être remplacées par d'autres groupements pour former des analogues mono-, bi-, ou hétéro-bi-fonctionnels tels que les dérivés bromo, amino, carboxyméthyl, succinimido succinate, tosylate, mésylate, aldéhyde, octadécylamine, monopalmitate, stéaryloxy, et le plus important monométhoxy du PEG¹⁶. Ayant un groupement hydroxyle bloqué, le monométhoxy-PEG permet de minimiser les possibilités de réticulation (cross-linking) lorsque plusieurs chaînes PEG doivent être attachées sur un substrat et d'augmenter ainsi l'homogénéité des produits finaux¹⁷. Par conséquent, des dérivés monométhoxy du PEG (MeO-PEG-OH) sont des candidats idéaux pour fonctionnaliser les

¹³ Kinstler O. Molineaux G., Treuheit M. Ladd D. and Gegg C. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2002**, 54, 477.

¹⁴ Molineaux G. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, 10, 1235.

¹⁵ Piedmonte D. M. and Treuheit M. J. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2008**, 60, 50.

¹⁶ Harris J. M., Kozlowski A. and Bentley M. D. *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Phys.* **1984**, 25, 325.

¹⁷ Zalipsky S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, 16, 157.

structures dendritiques afin d'augmenter la solubilité dans l'eau tout en diminuant la cytotoxicité et l'immunogénicité de ces derniers^{18,19,20,21}.

4.2.2 Utilisation d'un PEG amine

Des études préliminaires réalisées au sein du laboratoire ont montré que sur un dendrimère phosphoré, un PEG ayant une longue chaîne a une meilleure capacité solubilisante que plusieurs PEG de courte chaîne, pour un nombre d'unités total équivalent. C'est-à-dire qu'un dendrimère conjugué à un seul PEG5000 (114 unités) serait potentiellement plus soluble qu'un même dendrimère conjugué à 19 PEG250 (6 unités par PEG et 114 unités au total). Il paraît donc important de choisir un MeO-PEG de taille supérieure à 2000 g/mol. Néanmoins, plus le PEG est grand, plus il devient polydisperse, moins les modifications du PEG et leurs réactions avec le dendrimère sont contrôlables. Pour la mise au point de la synthèse du dendrimère possédant des chaînes PEG à la surface, nous avons préféré les dérivés monométhoxy du PEG750, soit d'environ 17 unités. Il est à noter que les PEG750 ont déjà une structure polydisperse, l'analyse en spectrométrie de masse (MALDI-TOF Dithranol) montre une distribution gaussienne (cf. Figure 4-1) et par conséquent, le nombre d'unités 17 n'est qu'une moyenne.

¹⁸ Kim Y., Klutz A. M. and Jacobson K. A. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1660.

¹⁹ Bhadra D. Bhadra S. and Jain N. K. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2005**, *8*, 467.

²⁰ Guillaudeu S.J., Fox M. E., Haidar Y. M., Dy E. E., Szoka F. C. and Fréchet J. M. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 461.

²¹ Kojima C., Kono K., Maruyama K. and Takagishi T. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 910.

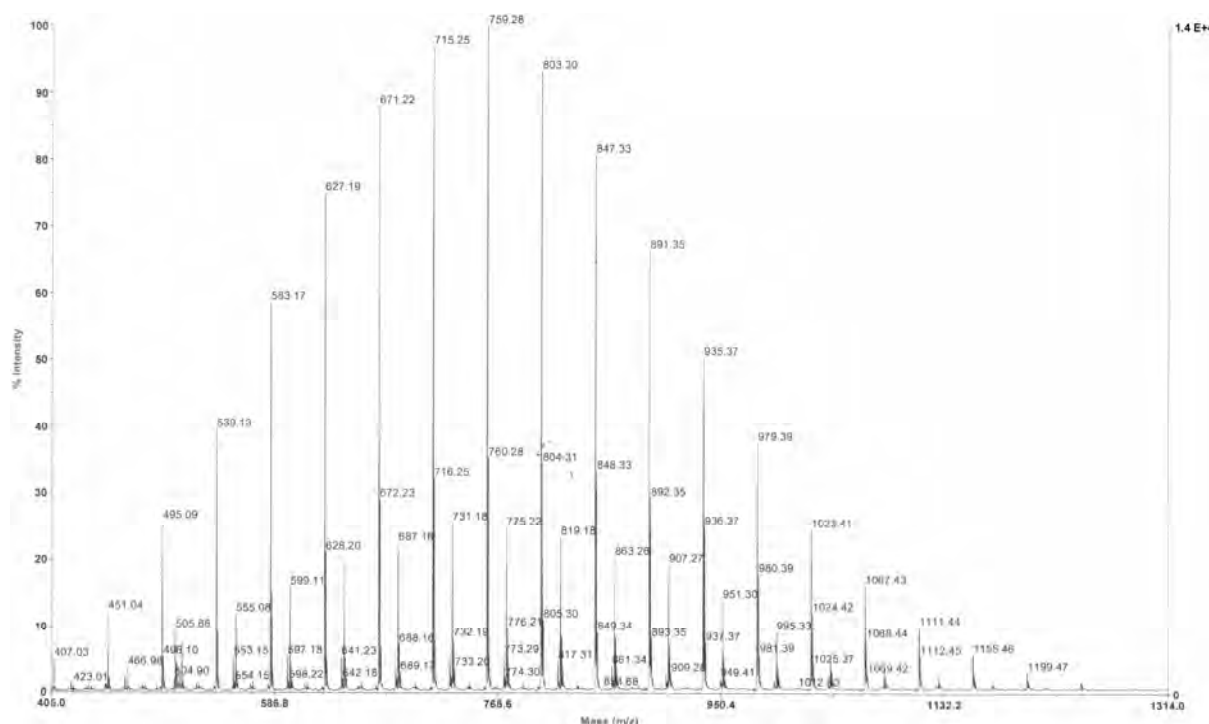


Figure 4-2 : Spectrométrie de masse en MALDI-TOF avec la matrice dithranol du monométhoxy PEG750

Pour être greffé directement sur le dendrimère phosphoré, le MeO-PEG doit posséder soit une amine, soit un phénol libre. Avec l'expansion des recherches en PEGylation dans le domaine biomédical, de nombreux dérivés du PEG sont commercialisés, parmi lesquels le MeO-PEG₁₇-NH₂ est un excellent candidat pour répondre à nos besoins.

Le greffage du MeO-PEG₁₇-NH₂ sur le dendrimère de 1^{ère} génération se fait dans le THF distillé en présence de la triéthylamine (cf. Figure 4-3). La di-substitution des groupements thiophosphine de surface ne semble pas être difficile, en revanche, la réaction n'est pas pour autant réussie. Sur le spectre RMN ³¹P (C₆D₆), les signaux correspondant respectivement aux phosphores du cœur cyclotriphosphazène (8,50 ppm) et à ceux de la périphérie (68,15 ppm) sont clairement observés, mais se présentent sous forme de multiplet, indiquant d'éventuels problèmes de symétrie dans la structure. D'autres signaux à 1, 80, 15,30, 45,33 et 58,50 ppm sont également observés, le dendrimère a subi des dégradations.

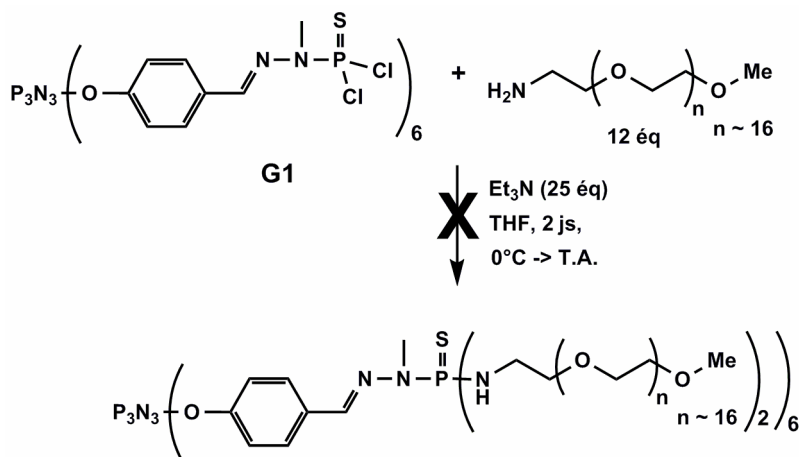


Figure 4-3 : Greffage du MeO-PEG₁₇-NH₂ sur le dendrimère de 1^{ère} génération

Le sel de triéthylammonium formé est filtré sur célite et le produit brut a été solubilisé dans un minimum de dichlorométhane et précipité dans l'éther à froid. Après plusieurs lavages, le spectre RMN est inchangé, ce qui confirme que ces impuretés sont liées au dendrimère.

L'expérience de greffage a été répétée une fois dans les mêmes conditions expérimentales avec un suivi régulier par la RMN ³¹P afin de savoir si le produit obtenu se dégrade dès le départ ou à cause d'une agitation prolongée en milieu basique. Il s'avère que des signaux indésirables apparaissent dès 3 heures de réaction, ce qui signifierait que le dendrimère se dégrade dans ces conditions, soit à cause de la triéthylamine qui est pourtant distillée, soit à cause de la présence d'impuretés dans le MeO-PEG₁₇-NH₂ non détectables par la RMN. Une tentative de greffage de ce même PEG sur le dendrimère en remplaçant la triéthylamine par le carbonate de césium a également été réalisée, le résultat est encore moins encourageant. L'explication la plus probable est que les chaînes PEG extrêmement hygroscopiques contiennent de l'eau, qui peut réagir en milieu basique sur les extrémités dichlorure de thiophosphine.

Néanmoins, les produits obtenus, malgré les imperfections, ont montré une bonne solubilité dans de très nombreux solvants tels que le THF, les solvants chlorés, les alcools et surtout l'eau. Ceci nous encourage dans la recherche d'une nouvelle stratégie pour obtenir un dendrimère-PEG "parfait".

4.2.3 Modification du monométhoxy PEG

Afin d'avoir une bonne maîtrise de la pureté des produits, nous avons décidé de synthétiser nos propres PEG fonctionnels à partir du MeO-PEG₁₇-OH commercial. Plusieurs choix sont possibles (cf. Figure 4-4) : i) transformer la fonction hydroxyle en azoture pour pouvoir le greffer sur un dendrimère-propargylamine via la réaction de cycloaddition de Huisgen ; ii) créer une fonction phénol à partir du groupement hydroxyle pour permettre un greffage direct et solide sur le dendrimère. Dans le premier cas, la transformation de l'hydroxyle en azoture est relativement aisée et est décrite dans de nombreux articles^{22,23,24,25}. La synthèse du dendrimère-propargylamine a déjà été mise au point au sein de l'équipe²⁶. La principale difficulté est sur la mise au point des conditions expérimentales compatibles avec la structure du dendrimère pour la cycloaddition de Huisgen entre les triples liaisons de surface et l'azoture du PEG. Dans le deuxième cas, le greffage d'un phénol sur le dendrimère phosphoré est habituel et offre souvent de très bons rendements de synthèse. Néanmoins, les PEG-phénol sont très peu décrits dans la littérature, les rares publications ou brevets traitant l'ajout d'un groupement phénol concernent surtout des OEG^{27,28} (oligoéthylène glycol) dont la manipulation, la caractérisation et la réactivité sont différentes de celles de leurs analogues polymériques. De ce fait, une mise au point pour la synthèse du PEG-phénol est nécessaire avant toute tentative de greffage sur le dendrimère. Les synthèses selon ces deux stratégies ont quasiment été menées en parallèle et la seconde option a offert des résultats plus concluants et constitue une voie de synthèse de dendrimères hydrosolubles très prometteuse.

²² Schwabacher A. W., Lane J. W., Schiesher M. W., Leigh K. M. and Johnson C. W. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1727.

²³ Garanti L. and Moteni G. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1133.

²⁴ Parrish B., Breitenkam R. B. and Emrick T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7404.

²⁵ Menger F. M. and Zhang H. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1414.

²⁶ Lartigue M.-L., Slany M., Caminade A.-M. and Majoral J.-P. *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1417.

²⁷ Mandal B. K., Walsh C. J., Sooksimuang T. and Behrooz S. *J. Chem. Mater.* **2000**, *12*, 6.

²⁸ Brockmann T. W. and Tour J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4437.

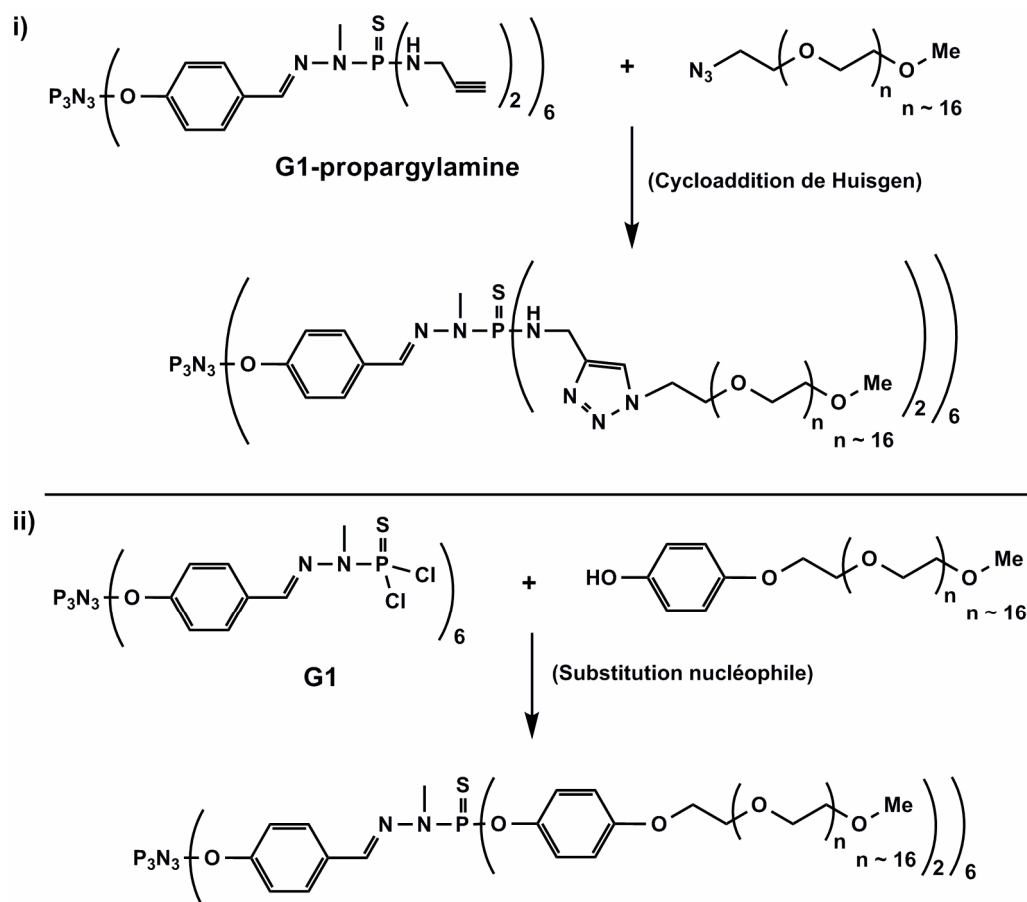


Figure 4-4 : Schéma global de deux stratégies pour la synthèse des dendrimères-PEG : i) par la "click chemistry" ; ii) par la synthèse d'un PEG-phénol

L'obtention du MeO-PEG₁₇-N₃ passe par l'activation de la fonction hydroxyle du MeO-PEG₁₇-OH par un groupement mésylate. La synthèse du MeO-PEG₁₇-Ms a été réalisée en présence de la triéthylamine dans deux solvants différents, le THF et le dichlorométhane (cf. Figure 4-5). Le suivi réactionnel par la CCM est impossible car la polarité du PEG n'est pas dominée par les extrémités fonctionnelles. En revanche, la RMN ¹³C est un moyen efficace pour indiquer l'avancement de la réaction. Lorsque les signaux à 61 et 72,5 ppm (CDCl₃) correspondant respectivement aux carbones en et du groupement hydroxyle disparaissent au profit des deux signaux à 68,7 et 69,4 ppm (CDCl₃) correspondant aux carbones en et du groupement mésylate, la réaction est complète. Il est impératif de s'assurer de l'absence de l'alcool pour éviter tout problème de synthèse par la suite.

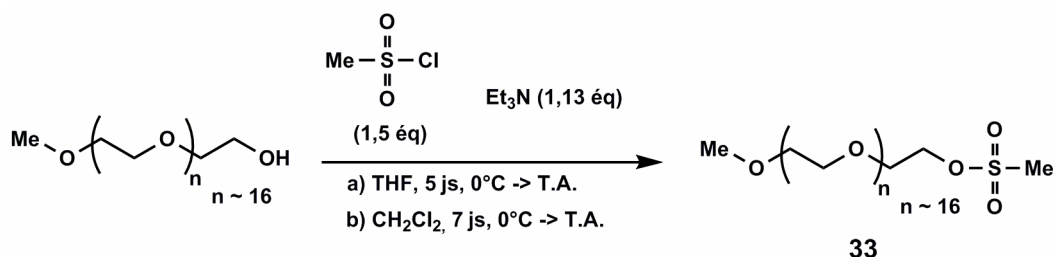


Figure 4-5 : Synthèse du PEG mésylate

Le produit peut être purifié par extraction au $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{NaHCO}_3$ pour donner le PEG **33** sous forme d'huile incolore avec un rendement de 76 % pour la réaction effectuée dans le dichlorométhane. L'obtention du composé **33** est également confirmée par l'apparition d'un signal à 37 ppm (CDCl_3) correspondant au méthyle du groupement mésylate qui est différent du signal correspondant au chlorure de méthane sulfonyle (52,6 ppm, CDCl_3). Pour la réaction effectuée dans le THF, le produit n'a pas été isolé et a été utilisé pour l'étape suivante après une simple filtration pour enlever le sel formé et une évaporation.

L'obtention de l'azoture du PEG **33** correspondant se fait dans l'éthanol 95 % à reflux avec un léger excès d'azoture de sodium (1,13 équivalents par rapport au PEG-OH du départ) (cf. Figure 4-6). La fin de la réaction est indiquée par la disparition des signaux à 3 ppm en RMN ^1H et à 37 ppm en RMN ^{13}C (CDCl_3) correspondant au méthyle du groupement mésylate. Une extraction au CH_2Cl_2 /solution de NaCl saturée suffit pour obtenir le PEG **34** sous forme d'huile jaunâtre avec un rendement global de 89 %.

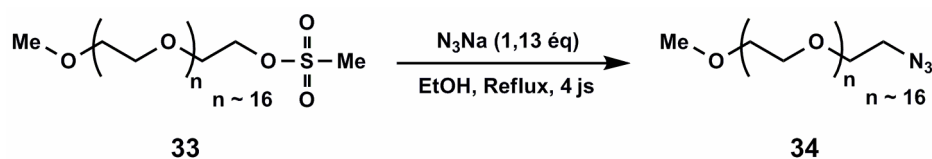


Figure 4-6 : Synthèse du PEG azoture

Parallèlement, un dendrimère-propargylamine de 1^{ère} génération a été obtenu par le greffage direct de la propargylamine distillée à la surface du dendrimère de 1^{ère} génération classique²⁹. La réaction se fait dans le THF distillé en présence de la propargylamine qui sert également de base (cf. Figure 4-7). Un essai de greffage a été réalisé plus tôt en présence de la triéthylamine mais le produit obtenu avait un défaut et n'était pas stable. Un autre intérêt

²⁹ Launay N., Slany M., Caminade A.-M. and Majoral J.-P. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 3799

d'utiliser la propargylamine comme base est dans la simplicité de la purification. En effet, il suffit de filtrer les sels formés et éliminer la propargylamine en excès par évaporation. Le dendrimère **35** est caractérisé en RMN ^{31}P (CDCl_3) par le signal à 9 ppm correspondant aux phosphores du cœur triphosphazène et le signal à 68,9 ppm correspondant aux phosphores substitués de la périphérie.

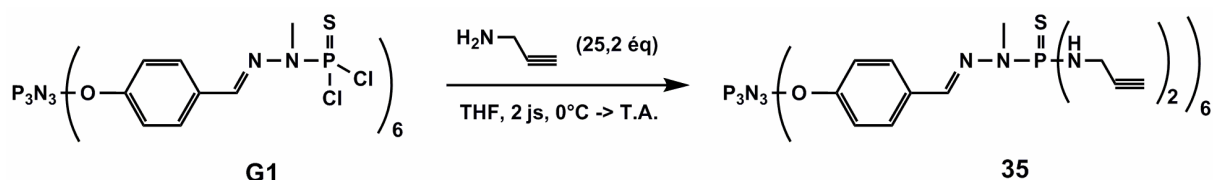


Figure 4-7 : Synthèse du dendrimère-propargylamine

La réaction de cycloaddition de Huisgen entre le PEG azoture **34** et le dendrimère alcyne **35** est catalysée par le Cu^{I} , généré *in situ*, à partir de CuSO_4 dans un mélange de DMF/eau (2/1, v/v) (cf. Figure 4-8). Les atomes de phosphore à la surface n'étant pas directement impliqués dans la réaction, leur déplacement chimique en RMN n'est pas significatif pour indiquer l'avancement de la réaction. La réaction est laissée sous agitation pendant 4 jours à 35°C avant d'être évaporée et extraite au dichlorométhane. La RMN ^1H (CDCl_3) de ce produit brut semble indiquer, par la présence d'un signal à 7,7 ppm qui correspond au proton du cycle triazole, que la réaction a bien eu lieu. En RMN ^{31}P , le signal correspondant aux atomes de phosphore à la périphérie se présente sous forme d'un multiplet centré sur 67,65 ppm (CDCl_3), vraisemblablement à cause des longueurs différentes des chaînes PEG que voient les atomes de phosphore. Néanmoins, faute de temps, l'optimisation de cette réaction n'a pas pu être effectuée. Par ailleurs, comparée à la voie de synthèse du dendrimère-PEG en passant par un PEG-phénol que nous allons découvrir par la suite, cette méthode paraît nettement moins rentable du fait de sa purification difficile. Mais cette expérience constitue tout de même un test préliminaire intéressant pour greffer d'autres macromolécules sur le dendrimère phosphoré par "click chemistry".

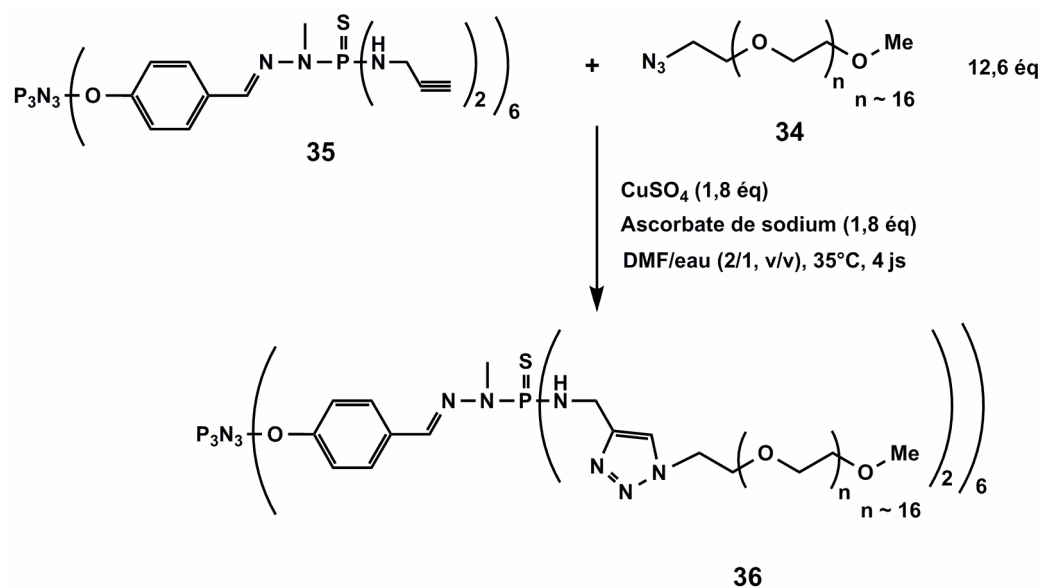
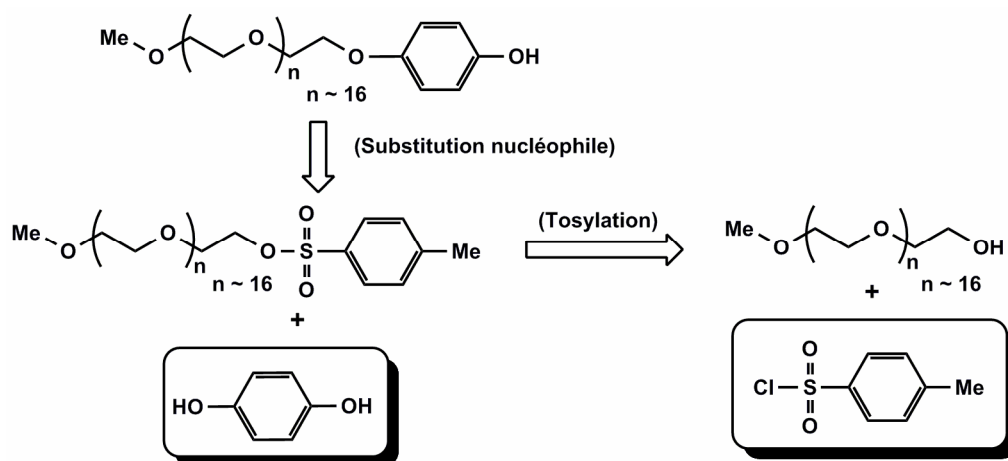


Figure 4-8 : Synthèse du dendrimère-PEG par "click chemistry"

4.2.4 Mise au point de la synthèse du dendrimère PEG via un PEG phénol

La deuxième stratégie pour la synthèse d'un dendrimère PEG est de créer une fonction phénol, un point d'ancrage, à partir de l'alcool du MeO-PEG-OH afin de pouvoir le greffer sur le dendrimère phosphoré. Parmi les rares travaux de recherche concernant les PEG phénol, plusieurs procèdent à la monosubstitution d'une molécule d'hydroquinone par un PEG activé qui peut être un PEG-Br²⁸ ou un PEG tosylate^{27,30}. Le PEG tosylate a finalement été choisi dans notre cas puisqu'il est plus facile à préparer en grande quantité²⁷ (cf. Figure 4-9).

³⁰ Liu J., Zhou Y., Wu Y., Li X. and Chan A. S. C. *Tetrahedron : Asymmetry* **2008**, 19, 832.

Figure 4-9 : Rétrosynthèse du MeO-PEG₁₇-phénol

La tosylation du MeO-PEG₁₇-OH a été réalisée selon le mode opératoire décrit par Liu *et coll.* dans le dichlorométhane en présence de la pyridine (cf. Figure 4-10). Comme dans le cas de la mésylation, la réaction est suivie en RMN ¹³C (CDCl₃) par la disparition des signaux à 61 et 72,5 correspondant respectivement aux carbones en et du groupement hydroxyle au profit des signaux à 68,5 et 69,4 ppm correspondant respectivement aux carbones en et du groupement tosylate. Le PEG tosylate **37** est obtenu après une extraction et une chromatographie sur colonne de silice avec un rendement de 40 %.

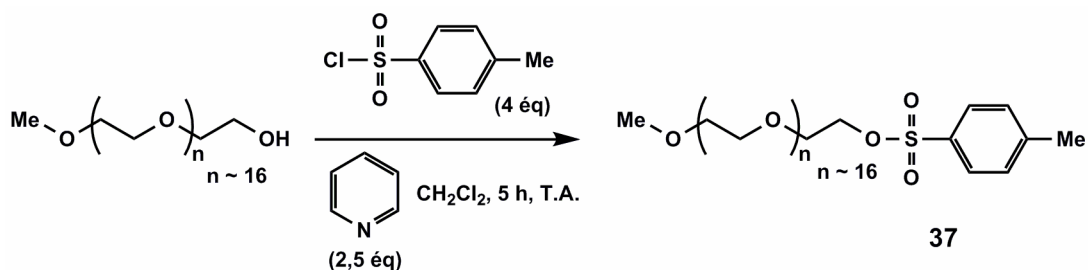


Figure 4-10 : Synthèse du PEG tosylate

Un premier essai de mono-substitution de l'hydroquinone par le PEG tosylate a été effectué dans le DMSO et en présence de l'hydroxyde de potassium (cf. Figure 4-11). Le mélange est laissé agiter pendant 12 heures sans suivi réactionnel. Après deux extractions respectivement avec eau/éther diéthylique et CHCl₃/eau, le produit brut a pu être analysé en RMN ¹H. Malheureusement, d'après le profil du spectre et les intégrations, cette réaction aurait conduit très majoritairement à la formation de l'hydroquinone di-substituée. Afin d'éviter la di-substitution et de faciliter le suivi de la réaction, un deuxième essai est mené

dans le THF en présence d'hydroxyde de potassium et avec une addition lente d'une solution de PEG tosylate sur l'hydroquinone en excès en solution diluée. La réaction est moins rapide que dans le cas du DMSO, le produit de la mono-substitution semble prendre une proportion plus importante mais il est également accompagné de plus de produits secondaires non identifiés. Cette méthode a été décrite par Mandal *et coll.*²⁷ pour la substitution d'un oligoéthylène glycol (OEG) (3 unités) sur l'hydroquinone, les produits mono- et di-substitués ont pu être séparés dans ce cas là. Or nous avons à faire à un PEG de 17 unités, s'il y a le mélange des deux espèces, mono- et di-substituées, la séparation serait extrêmement difficile. Le problème de di-substitution dans notre cas est dû à l'équivalence des deux fonctions phénol en termes de réactivité. En remplaçant une des deux fonctions phénol par un groupement plus réactif vis-à-vis du tosylate, le problème pourrait se résoudre. La 4-hydroxyphénylpipérazine utilisée précédemment pour la synthèse de la rhodamine-pipérazine (cf. Chapitre II) est un excellent candidat pour remplir ce rôle.

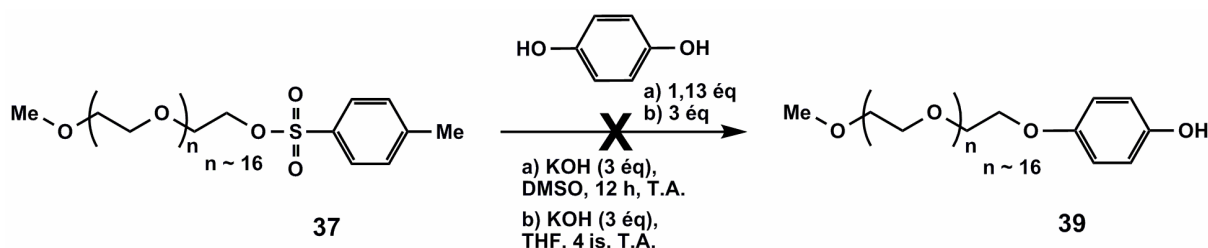


Figure 4-11 : Essai de mono-substitution de l'hydroquinone par le PEG tosylate

Le PEG tosylate **37** a été mis en solution avec la 4-hydroxyphénylpipérazine dans l'acétonitrile à reflux en présence de triéthylamine (cf. Figure 4-12). Le mode opératoire a été adapté à partir des travaux réalisés par Tahtaoui *et coll.*³¹ pour le greffage d'un OEG sur une pipérazine. Malgré la différence de réactivité, la substitution de la 4-hydroxyphénylpipérazine par le PEG tosylate n'a pas été suffisamment sélective.

³¹ Tahtaoui C., Parrot I., Klotz P., Guillier F., Galzi J.-L., Hibert M. and Ilie B. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4300.

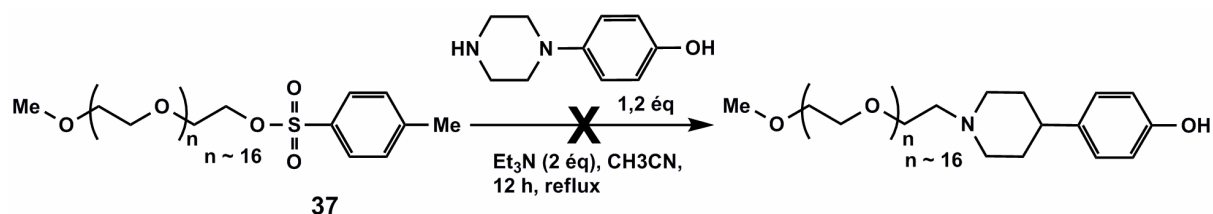


Figure 4-12 : Essai de synthèse du PEG-phénol par intermédiaire de la 4-hydrophénylpipérazine

Etant donnée la situation, le seul moyen d'éviter le problème de di-substitution serait de procéder à des étapes de protection-déprotection. L'hydroquinone peut être mono-protégée par un groupement benzyle, puis greffée sur le PEG mésylate par la fonction phénol libre. Le groupement benzyle pourra ensuite être éliminé par hydrogénation afin de libérer le phénol qui pourra assurer le greffage sur dendrimère (cf. Figure 4-13).

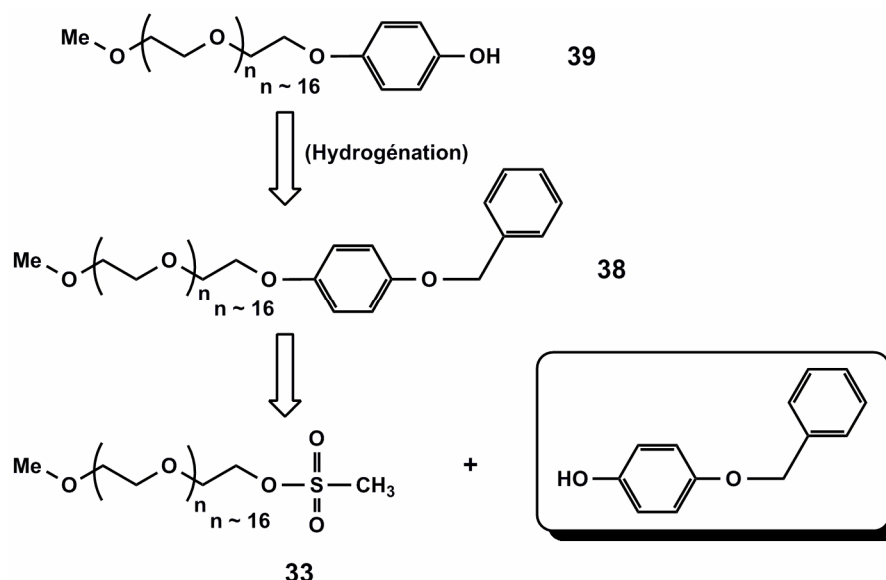


Figure 4-13 : Rétrosynthèse du PEG-phénol

L'hydroquinone mono-benzylée est une molécule commercialisée. Son greffage sur le PEG mésylate se fait dans le THF en présence du *tert*-butoxyde de potassium (cf. Figure 4-14), selon un brevet canadien et international³². La réaction peut être suivie par la RMN ¹H (CDCl₃) et la disparition du triplet à 4,22 ppm correspondant au CH₂ en du groupe mésylate au profit d'un triplet à 4 ppm correspondant au CH₂ en du groupement phénol benzylé

³² Aryl Carbamate Oligomers for Hydrolyzable Prodrugs and Prodrugs Comprising same. Ekwuribe N. N. and Odenbaugh A. L. International Patent WO 2005/016240 A2. 24 February 2005.

indique la fin de la réaction. Le PEG phénol benzylé **38** est obtenu après une chromatographie sur colonne de silice sous forme d'huile marron avec un rendement de 75 %.

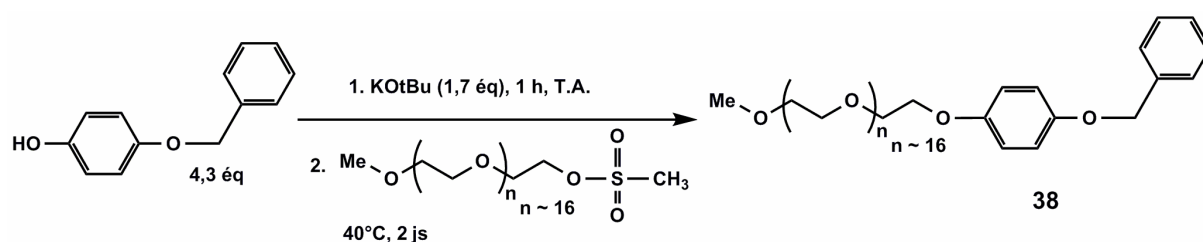


Figure 4-14 : Synthèse du PEG phénol benzylé

La débenzylation se fait généralement par hydrogénation catalysée par le palladium sur charbon actif (Pd/C). Une méthode alternative qui ne nécessite pas de mise en pression de gaz dihydrogène, donc facile à mettre en œuvre, est d'utiliser le formiate d'ammonium comme agent de transfert d'hydrogène. Pour ce faire, le PEG phénol benzylé **38** et le formiate d'ammonium sont solubilisés dans le méthanol en présence du Pd/C en suspension. La température de 40°C indiquée n'est pas forcément indispensable mais permet d'accélérer la débenzylation. La réaction est facilement suivie par la RMN ¹H et la disparition totale du signal à 5 ppm (CDCl₃) correspondant au CH₂ du benzyl indique la fin de la réaction. Après une filtration et une extraction (CH₂Cl₂/eau) pour enlever le Pd/C et l'excès de formiate d'ammonium, le MeO-PEG₁₇-phénol **39** est enfin obtenu sous forme d'huile jaunâtre avec un rendement de 70 %. Il est à noter que cette réaction ne génère pas d'autres produits secondaires que du toluène, si le rendement n'est pas élevé, c'est parce qu'une partie du produit est restée dans la phase aqueuse lors de l'extraction puisque le PEG est soluble à la fois dans le dichlorométhane et l'eau. Effectuer plusieurs lavages supplémentaires de la phase aqueuse avec du dichlorométhane permettrait éventuellement d'augmenter le rendement de cette réaction.

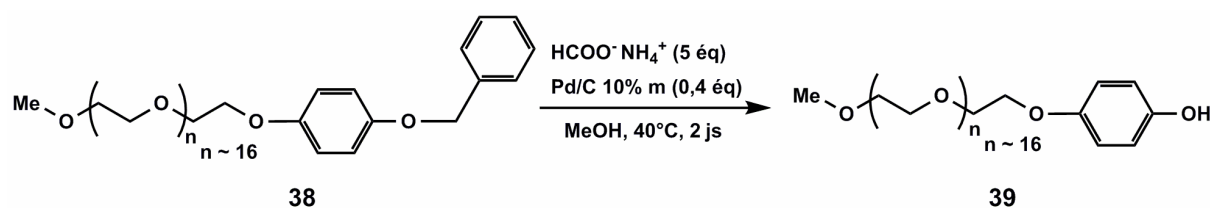


Figure 4-15 : Débenzylation par l'utilisation du formiate d'ammonium

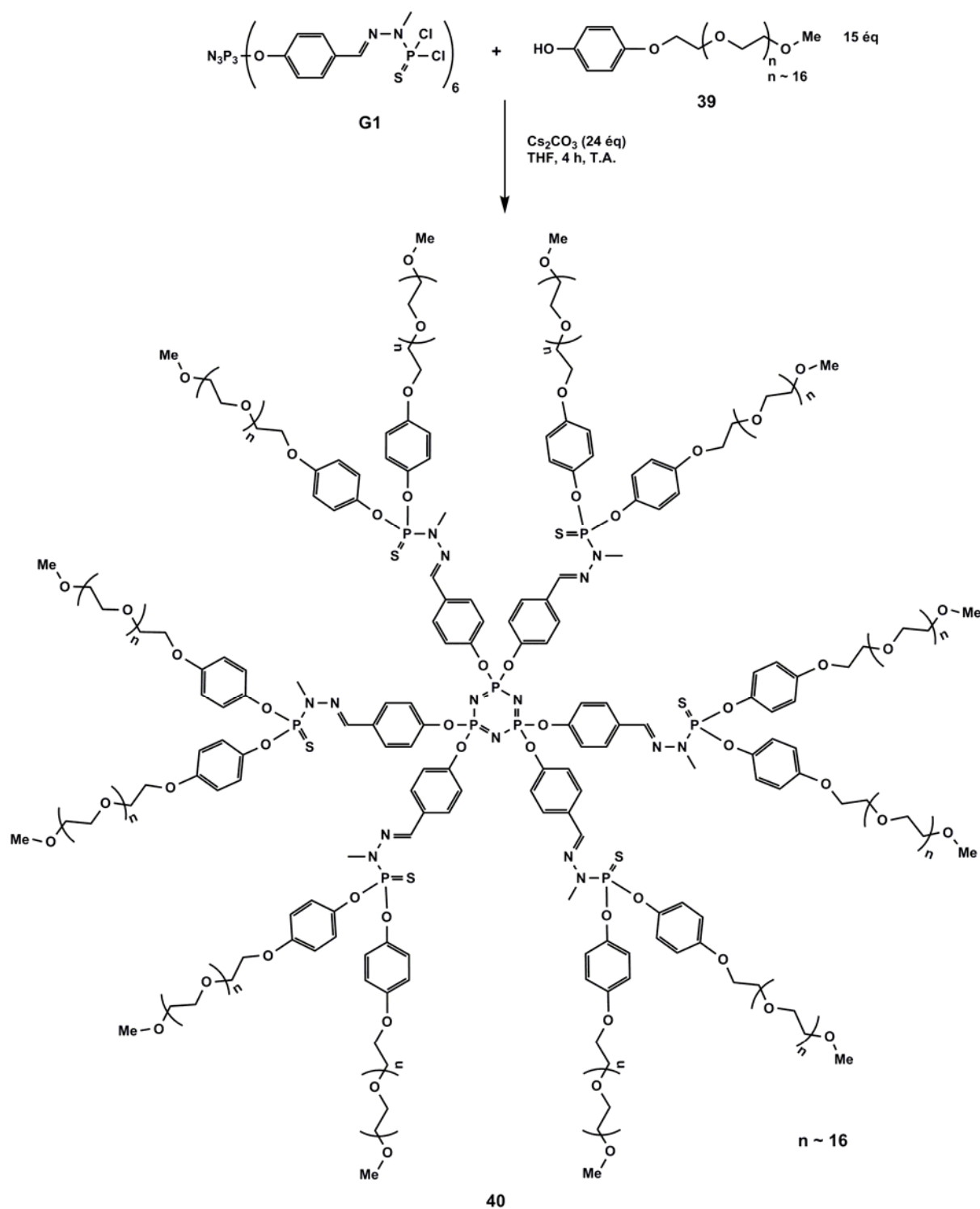


Figure 4-16 : Synthèse du dendrimère-PEG de 1^{ère} génération à partir du PEG phénol

Le greffage de ce PEG phénol **39** sur le dendrimère de 1^{ère} génération se fait dans des conditions classiques déjà décrites, c'est-à-dire dans le THF distillé en présence du carbonate de césium (cf. Figure 4-16). La réaction est suivie en RMN ^{31}P (CDCl_3) par le déplacement de 62,5 ppm à 64,5 ppm du signal correspondant aux phosphores de la périphérie. L'obtention du

produit d'intérêt est également caractérisée par l'apparition de deux doublets ($J = 8,4$ Hz) à 6,78 ppm et à 7,05 ppm (CDCl_3) correspondant aux protons aromatiques du PEG phénol greffé, sachant que ce phénol non greffé ne présente qu'un signal sous forme de singulet dans la zone aromatique. Le produit brut après la filtration est purifié par précipitation dans l'éther diéthylique suivie par une chromatographie sur colonne d'exclusion stérique pour donner le dendrimère-PEG **40** sous forme d'huile jaunâtre avec un rendement seulement de 45 %, à cause d'une perte importante lors de la chromatographie sur colonne d'exclusion stérique.

4.3 Propriétés physique et biologique

4.3.1 Expériences de diffusion en RMN

Afin d'étudier les propriétés comportementales du dendrimère PEG de 1^{ère} génération en solution, des expériences de diffusion en RMN de type DOSY ont été réalisées dans quatre solvants différents : le chloroforme, l'eau, le toluène, le diméthylsulfoxyde et l'eau. La RMN à gradient de champ pulsé (Pulsed Field Gradient NMR) a déjà été utilisée pour étudier l'influence de différents paramètres tels que le pH³³, la température³⁴, la concentration³⁵ ainsi que la nature des branches et des solvants^{36,37} sur la taille et la géométrie des dendrimères. Les expériences de diffusion en RMN de type DOSY permettent de mesurer le coefficient de diffusion D qui est lui-même relié au rayon hydrodynamique R_H (pour des particules sphériques) par l'équation de Stokes-Einstein $R_H = k_B T / 6 \pi \eta D$, où k_B est la constante de Boltzmann, T la température exprimée en Kelvin, et η la viscosité dynamique de la solution qui est inconnue. Pour remédier à ce problème, une référence interne dont le rayon

³³ Young J. K., Baker G. R., Newkome G. R., Morris K. F. and Johnson C. S. *Macromolecules* **1994**, 27, 3464.

³⁴ Rietveld I. B. and Bedeaux D. *Macromolecules* **2000**, 33, 7912.

³⁵ Sagidullin A. I., Muzafarov A. M., Krykin M. A., Ozerin A. N., Skirda V. D. and Igat'eva G. M. *Macromolecules* **2002**, 35, 9472.

³⁶ a) Hecht S., Vladimirov N. and Fréchet J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 18. b) Chasse T. L., Sachdeva R., Li Q., Li Z., Petrie R. J. and Gorman C. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8250.

³⁷ a) Leclaire J., Coppel Y., Caminade A.-M and Majoral J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2304. b) Leclaire J., Dagiral R., Fery-Forgues S., Coppel Y., Donnadieu B., Caminade A.-M. and Majoral J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15762.

hydrodynamique est invariable doit être introduite dans les échantillons. Ainsi, en faisant le rapport des coefficients de diffusion $D_{(\text{Réf})}/D$, qui est égal au rapport des rayons hydrodynamiques $R_H/R_{H(\text{Réf})}$, le rayon hydrodynamique recherché peut donc être obtenu avec la connaissance de celui de la référence.

Dans notre cas, le tétraméthylsilane (TMS) ayant un rayon hydrodynamique de 1,9 Å a été choisi comme une des références car il est soluble dans les solvants organiques étudiés et a précédemment été utilisé comme référence dans des études en DOSY pour déterminer les variations de rayons hydrodynamiques en utilisant l'équation $R_H/R_{H(\text{TMS})} = D_{(\text{TMS})}/D^{38}$. Pour la solution du dendrimère PEG dans l'eau, c'est le chlorure de tétraméthylammonium ayant un rayon hydrodynamique de 2,9 Å³⁹ qui a été choisi comme référence.

Ces expériences de diffusion en RMN ont été réalisées à température ambiante sur quatre solutions de dendrimère PEG **40** respectivement dans le chloroforme, le toluène, le diméthylsulfoxyde et l'eau à la même concentration de 6,84E-4 M. A chaque échantillon, est associée une courbe représentant l'intensité du signal de résonance normalisée en fonction de la force du gradient appliquée en RMN (cf. Figure 4-17). Le coefficient de diffusion des molécules contenues dans l'échantillon est obtenu par l'ajustement de cette courbe selon des fonctions mathématiques définies. Plus les points expérimentaux sont proches de la courbe ajustée, plus la valeur obtenue du coefficient de diffusion est fiable. Les expériences de diffusion en RMN dans notre cas ont été effectuées avec succès par Yannick Coppel, une des courbes représentant l'intensité du signal de résonance en fonction de la force du gradient est figurée ci-dessous :

³⁸ Cabrita E. J., Berger S. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, 39, S142.

³⁹ Yoshii N., Miura S. and Okazaki S. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, 345, 195.

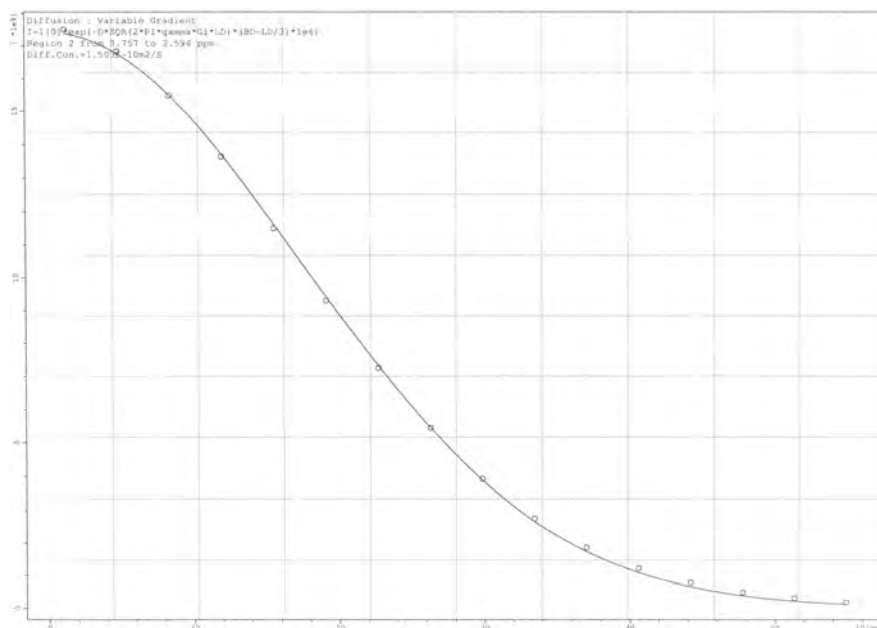


Figure 4-17 : Courbe représentant l'intensité du signal de résonance normalisée en fonction de la force du gradient du dendrimère-PEG dans le chloroforme. Axe des x : la force du gradient ; axe des y : l'intensité du signal de résonance normalisée.

Les coefficients de diffusion mesurés ainsi que les valeurs des rayons hydrodynamiques calculées selon l'équation décrite ci-dessus sont récapitulés dans le tableau 4-1. Le plus grand rayon hydrodynamique du dendrimère-PEG a été obtenu dans l'eau avec une valeur de 41 Å, quasiment le double de la valeur obtenue pour le dendrimère-PEG dans le chloroforme. Ce résultat est parfaitement logique dans la mesure où les chaînes PEG en surface du dendrimère sont beaucoup plus étendues dans un solvant polaire comme l'eau qui est capable d'établir de nombreuses liaisons hydrogènes avec les chaînes PEG. Le DMSO ayant une polarité intermédiaire entre le chloroforme et l'eau, le dendrimère-PEG dans le DMSO a une taille également intermédiaire entre celui dans le chloroforme et celui dans l'eau. Néanmoins, la valeur du rayon hydrodynamique obtenue pour le dendrimère-PEG dans le toluène est surprenante. En effet, d'après le raisonnement basé sur la polarité du solvant, le dendrimère-PEG dans le toluène devrait être moins volumineux que lorsque qu'il est solubilisé dans le chloroforme, or il a un rayon hydrodynamique comparable à celui dans le DMSO.

Tableau 4-1 : Paramètres de diffusion et de géométrie du dendrimère-PEG dans les solvants différents

Solvant	$D_{(Réf)} (m^2/s)$	$D (m^2/s)$	$R_{H(Réf)} (Å)$	$R_H (Å)$
CHCl ₃	1,683E-9	1,503E-10	1,9 ^(a)	21,3
Toluène	1,872E-9	1,364E-10	1,9 ^(a)	26,1
DMSO	5,099E-10	3,620E-11	1,9 ^(a)	26,8
H ₂ O	7,926E-10	5,602E-11	2,9 ^(b)	41,0

(a) Tétraméthylsilane ; (b) Chlorure de tétraméthylammonium

Il a été montré auparavant que certains copolymères contenant le PEG présentent des variations de propriétés physiques importantes en fonction de la température⁴⁰, nous avons également voulu étudier l'influence de la température sur le rayon hydrodynamique du dendrimère-PEG en solution. Le toluène et l'eau ont été choisis pour cette étude car ils permettent de fournir une plage de variation de température importante. Malheureusement, des problèmes de convection ont été rencontrés lors des expériences de diffusion dans le toluène, ce qui fausse les résultats. En effet, lors de la variation de température par réchauffement ou refroidissement, un gradient de température peut être créé au sein de la solution, en raison du grand volume de l'échantillon, ce qui entraîne une convection naturelle du fluide car la densité du fluide devient hétérogène. Ce mouvement du fluide entraîne les molécules qui y sont solubilisées, le dendrimère-PEG et la référence, les coefficients de diffusion ainsi mesurés ne peuvent donc pas correspondre aux diffusions naturelles du dendrimère-PEG ni de la référence. Ce problème pourrait éventuellement être remédié en utilisant des tubes RMN de volume moins important afin d'éviter la survenue du gradient de température, responsable de la convection.

4.3.2 Cytotoxicité du dendrimère-PEG

Des tests de viabilité cellulaire (Test MTT) sur deux lignées cellulaires ont été réalisés au laboratoire de biophysique cellulaire à l'IPBS afin de vérifier la cytotoxicité du dendrimère-PEG (cf. Figure 4-18). Dans le cas de la lignée B16F10, la viabilité des cellules

⁴⁰ Chung Y.-M., Simmons K. L., Gutowska A. and Jeong B. *Biomacromolecules* **2002**, 3, 511.

reste proche de 100 % jusqu'à la concentration de 400 μ M. Pour les cellules NIH 3T3, le dendrimère-PEG semble être très bien toléré à des concentrations inférieures à 100 μ M et commence à poser des problèmes à de fortes concentrations pour atteindre à une viabilité cellulaire voisine de 70 % pour la concentration de 400 μ M. Néanmoins, dans ce cas dernier, les barres d'erreur sont très grandes, des expériences supplémentaires seront nécessaires afin de conclure sur la toxicité de ce dendrimère-PEG sur les cellules NIH 3T3.

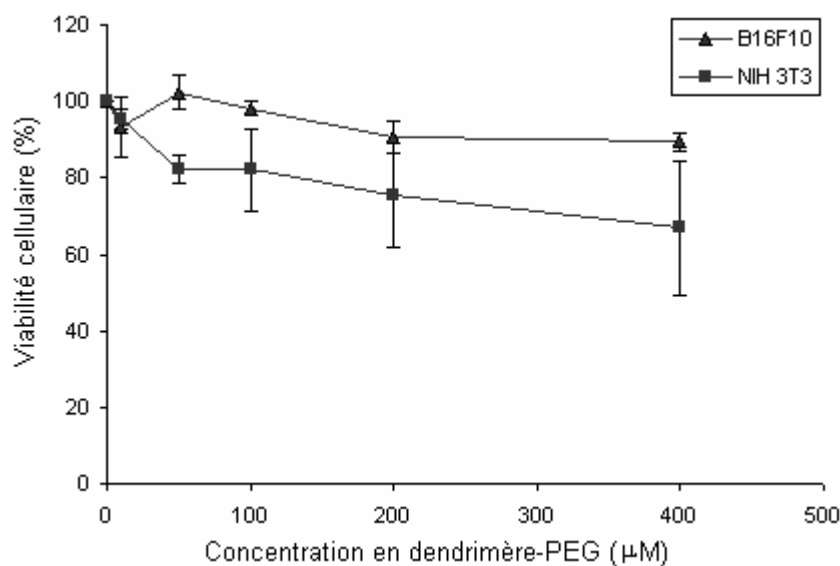


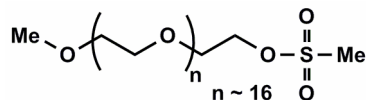
Figure 4-18 : Test de MTT : viabilité cellulaire en fonction de la concentration en dendrimère-PEG

4.4 Conclusion

La synthèse d'un PEG phénol de 17 unités en moyenne a été mise au point au cours de cette partie de thèse. Ce PEG phénol a pu être greffé sur un dendrimère de 1^{ère} génération sans difficulté selon le mode opératoire classique. Le nouveau dendrimère-PEG a été étudié en RMN diffusion (DOSY) afin de connaître l'influence du solvant sur la géométrie de ce dendrimère. Le plus grand rayon hydrodynamique du dendrimère-PEG a été obtenu dans l'eau, le solvant dans lequel les chaînes PEG sont le mieux solvatées. Les tests préliminaires de toxicité sur deux lignées cellulaires montrent que ce nouveau dendrimère ne présente aucun effet toxique pour la lignée B16F10. Il semble être moins toléré par la lignée NIH 3T3 à partir de fortes concentrations, mais ce dernier résultat reste à confirmer ou infirmer par des expériences supplémentaires.

4.5 Partie expérimentale

Composé 33 : MeO-PEG₁₇-OMs

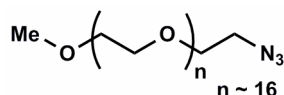


A une solution de MeO-PEG₁₇-OH (7,35 g, 9,8 mmol) dans le dichlorométhane (30 mL), séchée précédemment sur tamis moléculaire et refroidie à 0°C à l'aide d'un bain de glace, ont été ajoutés successivement la triéthylamine distillée (1,56 mL, 11,2 mmol) et le chlorure de méthane sulfonyle (0,87 mL, 11,2 mmol). Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 7 jours. Le mélange réactionnel a ensuite été filtré et extrait avec une solution de NaHCO₃ saturée (x 2). La phase organique a été récupérée, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée à sec pour donner le composé **33** sous forme d'huile incolore (78 %).

RMN ¹H (CDCl₃, 250,1 MHz) : Δ = 3,01 (s, 3H, SO₂-CH₃), 3,30 (s, 3H, CH₃-O-CH₂), 3,40 – 3,70 (m, 60H, CH₂), 4,28 (m, 2H, CH₂-O-SO₂) ppm.

RMN ¹³C{¹H} (CDCl₃, 75,5 MHz) : Δ = 37,42 (s, SO₂-CH₃), 58,68 (s, CH₃-O-CH₂), 68,71 (s, CH₂-CH₂-O-SO₂), 69,40 (s, CH₂-CH₂-O-SO₂), 70,17, 70,19, 70,25 (m, CH₂), 71,62 (s, CH₃-O-CH₂-CH₂) ppm.

Composé 34 : MeO-PEG₁₇-N₃



A une solution de MeO-PEG₁₇-OH (2,0 g, 2,66 mmol) dans le THF distillé (10 mL), séchée précédemment sur tamis moléculaire et refroidie à 0°C à l'aide d'un bain de glace, ont été ajoutés successivement la triéthylamine distillée (0,42 mL, 3,0 mmol) et le chlorure de méthane sulfonyle (0,31 mL, 4,0 mmol). Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 5 jours avant d'être filtré et évaporé à sec. Sans purification, le produit brut

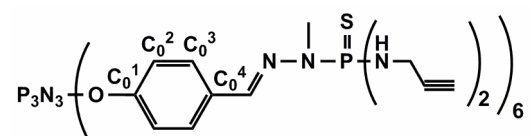
a été repris dans l'éthanol 95 % (10 mL), l'azoture de sodium (200 mg, 3,0 mmol) a été ajouté à la solution et le mélange réactionnel a été agité de nouveau à reflux pendant 4 jours avant d'être évaporé. Le produit brut a été solubilisé dans le dichlorométhane et extrait avec une solution saturée en chlorure de sodium (x 3). Les phases organiques ont été regroupées, séchées sur sulfate de magnésium et évaporées à sec pour donner le composé **34** sous forme d'huile jaunâtre (89 %).

RMN ^1H (CDCl_3 , 250,1 MHz) : $\Delta = 3,19$ (s, 3H, $\underline{\text{CH}_3}\text{-O-CH}_2$), 3,40 – 3,70 (m, 60H, CH_2) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz) : $\Delta = 50,57$ (s, $\text{CH}_2\text{-N}_3$), 58,90 (s, $\underline{\text{CH}_3}\text{-O-CH}_2$), 69,94, 70,40, 70,48 (m, CH_2), 71,83 (s, $\text{CH}_3\text{-O-CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}_2}$) ppm.

SM-MALDI-TOF (Dithranol) : distribution gaussienne centrée sur 733,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ avec $\Delta m = 44$.

Composé **35** : dendrimère-propargylamine²⁹



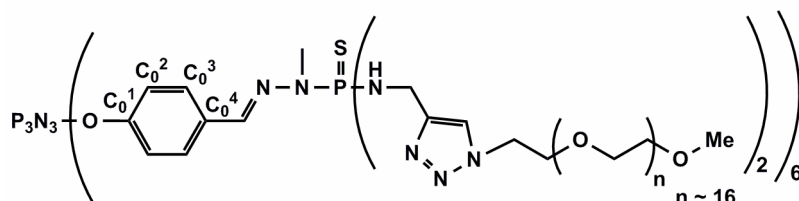
A une solution de dendrimère de 1^{ère} génération (100 mg, 54,7 μmol) dans le THF distillé (5 mL) refroidie à 0°C à l'aide d'un bain de glace, a été ajoutée la propargylamine distillée (88 μL , 1,38 mmol). Le mélange réactionnel est laissé agiter à température ambiante pendant 2 jours, puis est filtré, évaporé et séché sous vide pour donner le composé **35** sous forme de solide blanc (rendement quasi-quantitatif).

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz) : $\Delta = 8,21$ (s, P_3N_3), 67,58 (s, $\text{P}=\text{S}$) ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz) : $\Delta = 2,25$ (t, $^4J_{\text{HH}} = 2,4$ Hz, 6H, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 3,19 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9,9$ Hz, 18H, N-CH_3), 3,65, 3,83 (2m, 36H, $\underline{\text{NH}}\text{-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$, $\text{NH-}\underline{\text{CH}_2}\text{-C}\equiv\text{CH}$), 7,00 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz 12H, $\text{C}_0^2\text{-H}$), 7,51 (m, 18H, $\text{C}_0^3\text{-H}$, $\text{CH}=\text{N}$) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz) $\Delta = 30,3, 30,4$ (d, $^2J_{\text{CP}} = 12,0$ Hz, P-N- CH_3), 31,2 (s, NH- $\underline{\text{CH}_2}$ - $\text{C}\equiv\text{CH}$), 70,8 (s, CH_2 - $\underline{\text{C}\equiv\text{CH}}$), 80,6 (s, CH_2 - $\underline{\text{C}\equiv\text{CH}}$), 120,8 (s, C_0^2), 127,3 (s, C_0^3), 132,4 (s, C_0^4), 136,0 (s, $\text{CH}=\text{N}$), 150,0 (s, C_0^1).

Composé 36 :

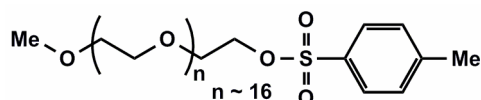


A une solution de PEG **34** (500 mg, 0,65 mmol) dans le DMF (6 mL), ont été ajoutés successivement le dendrimère **35** (105 mg, 51,2 μmol), une solution d'ascorbate de sodium (18 mg, 92 μmol) dans l'eau distillée (1,5 mL), et une solution de CuSO_4 (15 mg, 92 μmol) dans l'eau distillée (1,5 mL). Le mélange réactionnel a été agité à 35°C pendant 4 jours avant d'être co-éaporé avec du toluène et extrait au dichlorométhane. Le composé **36** n'a pas pu être isolé pur mais quelques indications concernant les caractéristiques en RMN peuvent être données ci-dessous.

RMN ^{31}P (CDCl_3 , 121,5 MHz) : d = 8,28 (s, P_3N_3), 67,51, 67,63, 67,72, 67,82 (m, P=S)

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz) : $\Delta = 3,0 - 3,15$ (m, 18H, N- CH_3), 3,20 – 3,85 (m, O- $\underline{\text{CH}_2}$ - $\underline{\text{CH}_2}$, O- CH_3), 4,10 – 4,50 (m, 36H, $\underline{\text{NH}}$ - CH_2 -C, NH- $\underline{\text{CH}_2}$ -C), 6,87 (sl, 12H, C_0^2 -H), 7,30 – 7,50 (m, 18H, C_0^3 -H, $\text{CH}=\text{N}$), 7,7 (m, 12H, N=N-N-CH) ppm.

Composé 37 : PEG tosylate



A une solution de MeO-PEG₁₇-OH (3 g, 4 mmol) dans le dichlorométhane (10 mL), séchée précédemment sur tamis moléculaire, ont été ajoutés le chlorure de *p*-toluènesulfonyle (3 g, 15,8 mmol) et la pyridine (0,8 mL, 9,9 mmol). Le mélange réactionnel est laissé agiter

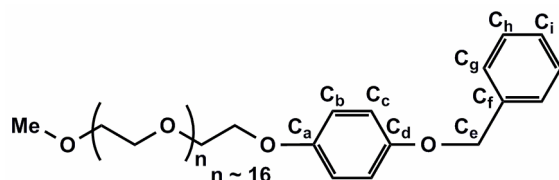
pendant 5 heures à température ambiante avant addition d'acide chlorhydrique 10 % (40 mL). Le tout est extrait au dichlorométhane (20 mL x 3), les phases organiques sont combinées, séchées sur sulfate de magnésium et évaporées. Le produit brut est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice pour donner le PEG tosylate **37** sous forme d'huile incolore (40 %).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz) : Δ = 2,37 (s, 3H, $\text{SO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_3$), 3,29 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 3,40 – 3,85 (m, \sim 53H, CH_2), 4,07 (t, $^3J_{\text{HH}} = 4$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-SO}_2$), 7,27 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,7$ Hz, 2H, $\text{SO}_2\text{-C-CH-CH}$), 7,71 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,7$ Hz, 2H, $\text{SO}_2\text{-C-CH-CH}$) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 300,1 MHz) : Δ = 21,71 (s, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_3$), 58,68 (s, $\text{CH}_3\text{-O-CH}_2$), 68,51 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-SO}_2$), 69,38 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-SO}_2$), 70,31, 70,40, 70,52 (m, CH_2), 71,78 (s, $\text{CH}_3\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2$), 127,78 (s, $\text{SO}_2\text{-C-CH-CH}$), 129,82 (s, $\text{SO}_2\text{-C-CH-CH}$), 132,67 (s, $\text{SO}_2\text{-C-CH-CH-C}$), 145,09 (s, $\text{SO}_2\text{-C-CH-CH-C}$) ppm.

SM-MALDI-TOF (Dithranol) : distribution gaussienne centrée sur 913,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ avec $\Delta m = 44$

Composé **38** : PEG phénol benzylé



A une solution de 4-(benzyloxy)phénol (1 g, 5 mmol) dans le THF distillé (10 mL), a été ajouté le *tert*-butoxyde de potassium (224 mg, 2 mmol) et le mélange réactionnel est laissé agiter à température ambiante pendant 1 heure. Une solution de PEG mésylate **33** (1,25 g, 1,16 mmol) dans le THF distillé (10 mL) a ensuite été ajoutée au mélange réactionnel précédent et le mélange est laissé agiter à 40°C pendant 2 jours. Le méthanol a été ajouté et le mélange réactionnel a été filtré sur célite et évaporé. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne de silice en utilisant l'éther diéthylique puis le mélange éther

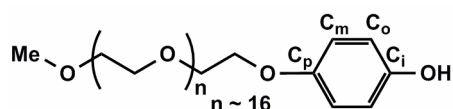
diéthylique/méthanol (9/1, v/v) comme éluant pour donner le PEG-phénol benzylé **38** sous forme d'huile marron (75 %).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz) : $\Delta = 3,36$ (s, 3H, $\underline{\text{CH}_3}\text{-O-CH}_2$), 3,45 – 3,85 (m, ~ 64H, CH_2), 4,06 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-C}_a$), 4,99 (s, 2H, $\text{C}_e\text{-H}_2$), 6,80 – 6,90 (m, 4H, C_bH , $\text{C}_c\text{-H}$), 7,23 – 7,45 (m, 5H, $\text{C}_g\text{-H}$, $\text{C}_h\text{-H}$, $\text{C}_i\text{-H}$) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz) : $\Delta =$, 58,88 (s, $\underline{\text{CH}_3}\text{-O-CH}_2$), 68,03 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-C}_a$), 69,82 (s, $\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_2\text{-O-C}_a$), 70,47, 70,54, 70,63, 70,76 (m, $\text{CH}_2(\text{PEG})$, C_e), 71,90 (s, $\text{CH}_3\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2$), 115,58, 115,75 (2s, C_b , C_c), 127,45 (s, C_g), 127,85 (s, C_i), 128,51 (s, C_h), 137,25 (s, C_f), 153,12 (s, C_a , C_d) ppm.

SM-MALDI-TOF (Dithranol) : distribution gaussienne centrée sur 913,6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ avec $\Delta m = 44$

Composé **39** : PEG phénol



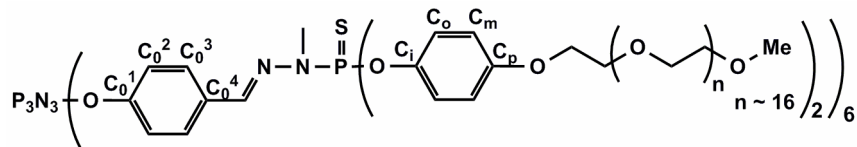
A une solution de PEG-phénol benzylé **38** (2,37 g, 2,49 mmol) dans le méthanol (40 mL), ont été ajoutés successivement le palladium sur charbon actif 10 %m (1,1 g, 1,03 mmol de Pd) et le formiate d'ammonium (787 mg, 12,5 mmol) et le mélange réactionnel est laissé agiter à 40°C pendant 2 jours. Le mélange réactionnel a été filtré sur célite pour enlever le Pd/C 10 %m et est évaporé à sec. Le produit brut est repris dans le dichlorométhane et extrait à l'eau distillée. La phase organique a été récupérée, filtrée sur sulfate de magnésium et évaporée pour donner le MeO-PEG₁₇-phénol **39** sous forme d'huile jaunâtre (70 %).

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz) : $\Delta = 3,34$ (s, 3H, $\underline{\text{CH}_3}\text{-O-CH}_2$), 3,45 – 3,85 (m, ~ 62H, CH_2), 4,01 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-C}_p$), 6,73 (s, 4H, $\text{C}_m\text{-H}$, $\text{C}_o\text{-H}$) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz) : $\Delta =$ 58,97 (s, $\underline{\text{CH}_3}\text{-O-CH}_2$), 68,14 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-C}_p$), 69,87 (s, $\underline{\text{CH}_2}\text{-CH}_2\text{-O-C}_p$), 70,51, 70,58, 70,60, 70,72 (m, CH_2), 71,88 (s, $\text{CH}_3\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2$), 115,69, 116,01 (2s, C_m , C_o), 152,24 (s, C_i , C_p) ppm.

SM-MALDI-TOF (Dithranol) : distribution gaussienne centrée sur 807,6 $[M+H]^+$ avec $\Delta m = 44$

Composé 40 : Dendrimère-PEG



Chapitre

5

Dendrimères à absorption biphotonique

Table des matières

5.1	Introduction	192
5.2	Dendrimères biphoton et leurs propriétés photophysiques	197
5.2.1	Dendrimères ayant des fluorophores biphoton à la surface	197
5.2.2	Dendrimère bicouche	201
5.2.3	Propriétés photophysiques.....	205
5.2.3.1	Fluorophores biphotons en surface du dendrimère.....	205
5.2.3.2	Dendrimère bicouche	208
5.3	Dendrimère-PEG à absorption biphotonique et ses propriétés	210
5.3.1	Synthèse du dendrimère-PEG à absorption biphotonique	210
5.3.2	Imagerie du dendrimère-PEG à absorption biphotonique.....	211
5.3.2.1	Etudes spectroscopiques préliminaires	211
5.3.2.2	Toxicité cellulaire	212
5.3.2.3	Imagerie en microscopie à absorption biphotonique	213
5.4	Conclusion	216
5.5	Partie expérimentale	217

5.1 Introduction

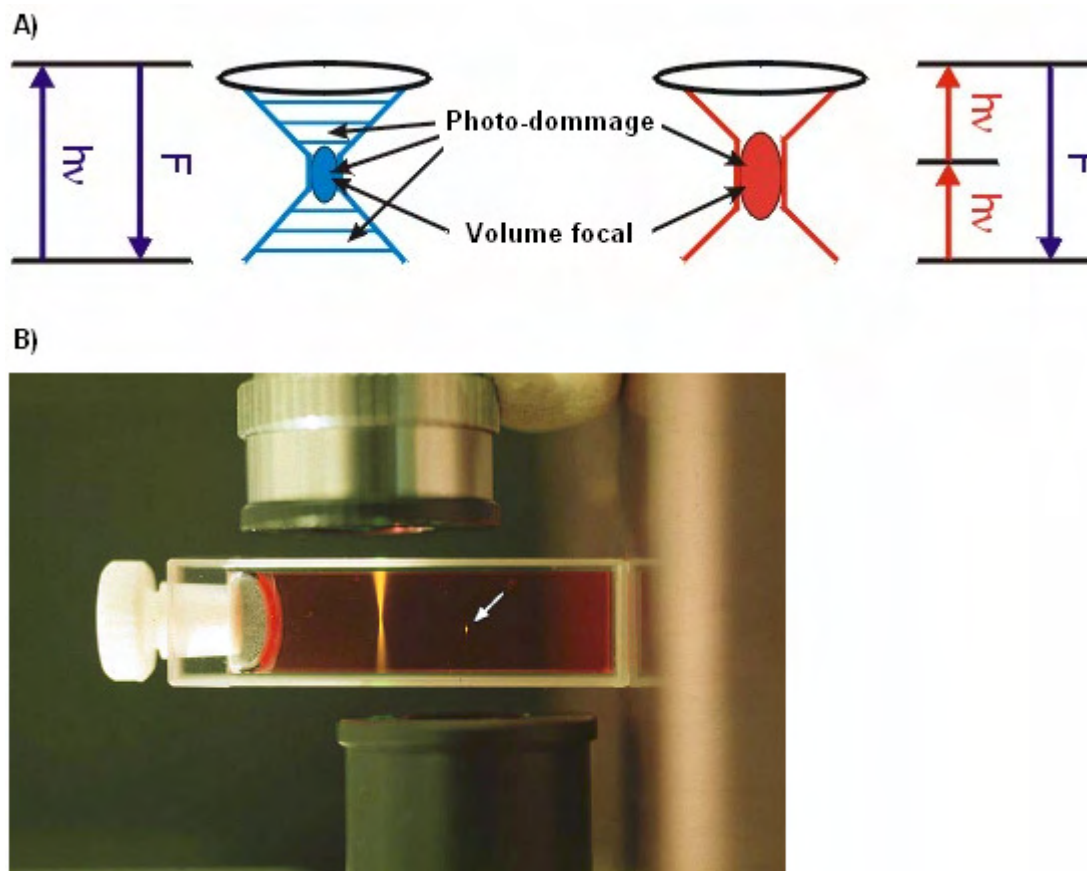


Figure 5-1 : A) Principe de fluorescence induite par excitation à un photon (gauche) et par excitation à deux photons (droite)¹ ; B) Comparaison des volumes excités dans le cas des excitations à un photon (543 nm) et à deux photons (1046 nm, voir flèche)².

Récemment, l'absorption moléculaire à deux photons (Two-photon absorption en anglais ou TPA) a attiré beaucoup d'attention grâce à ses applications dans différents domaines tels que la spectroscopie^{3,4}, le stockage de données optiques en 3D^{5,6,7}, la microfabrication^{8,9}, l'imagerie à haute résolution des systèmes biologiques en 3D^{10,11,12}, et la

¹ http://www.fz-juelich.de/isb/isb-1/Two-Photon_Microscopy/

² Oheim M., Michael D. J., Geisbauer M., Madsen D. and Chow R. H. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2006**, 58, 788.

³ Birge R. R. *Acc. Chem. Res.* **1986**, 19, 138.

⁴ Shima S., Ilagan R. P., Gillespie N., Sommer B. J., Hiller R. G., Sharples F. P., Frank H. A. and Birge R. R. *J. Phys. Chem.* **2003**, 107, 8052.

⁵ Parthenopoulos D. A. and Rentzepis P. M. *Science* **1989**, 245, 843.

⁶ Strickler J. H. and Webb W. W. *Opt. Lett.* **1991**, 16, 1780.

⁷ Dvornikov A. S. and Rentzepis P. M. *Opt. Commun.* **1995**, 119, 341.

⁸ Maruno S., Nakamura O. and Kawata S. *Opt. Lett.* **1997**, 22, 132.

thérapie photodynamique^{13,14}. Parmi toutes ces applications, la fluorescence par excitation biphotonique a suscité un grand intérêt en biologie et a donné lieu à la technique de microscopie de fluorescence à deux photons^{10,11,12}.

Dans le cas de la fluorescence par excitation à un photon, un photon d'une certaine énergie est absorbé par un fluorophore qui passe à l'état excité et qui émet un photon d'énergie plus basse pour retourner à son état fondamental. Par définition, la fluorescence par excitation à deux photons est basée sur le fait que l'absorption quasi-simultanée de deux photons d'énergie basse puisse exciter un fluorophore qui peut émettre par la suite un photon d'énergie plus importante que chacun des deux photons absorbés (cf. Figure 5-1). La probabilité de l'absorption quasi-simultanée de deux photons est extrêmement faible. Par conséquent, l'utilisation d'un flux important de photons d'excitation, en général un laser femtoseconde est nécessaire.

L'utilisation du processus d'excitation à deux photons à la place de l'excitation conventionnelle à un photon dans le domaine de l'imagerie *in vivo* offre de nombreux avantages : i) un espace d'excitation hautement confiné et une résolution tridimensionnelle intrinsèque ; ii) des photo-dommages limités au volume focal ; iii) une meilleure pénétration dans les tissus en utilisant des photons de longueur d'onde proche-infrarouge, en effet, la diffusion de la lumière étant inversement proportionnelle à la longueur d'onde à la puissance 4, plus la longueur d'onde est grande, moins il y a la diffusion et moins il y a la perte. La bonne performance de la fluorescence par excitation à deux photons repose sur les chromophores qui possèdent de grandes sections efficaces d'absorption et qui permettent de réduire l'intensité de l'excitation en augmentant l'efficacité et la spécificité de celle-ci. Depuis

⁹ Lemerrier G., Mulatier J.-C., Martineau C., Anémian R., Andraud C., Wang I., Stéphan O., Amari N. and Baldeck P. C. R. *Chimie* **2005**, 8, 1308.

¹⁰ Denk W., Strickler J. H. and Webb W. W. *Science* **1990**, 248, 73.

¹¹ Xu C., Zipfel W., Shear J. B., Williams R. M. and Webb W. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1996**, 93, 10763.

¹² Zipfel W. R., Williams R. M., Christie R., Nikitin A. Y., Hyman B. T. and Webb W. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2003**, 100, 7075.

¹³ Bhawalkar J. D., Kumar N. D., Zhao C. F. and Prasad P. N. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **1997**, 15, 201.

¹⁴ Ogawa K. and Kobuke Y. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. **2008**, 8, 269.

ces dernières années, nombre de travaux de recherche sont consacrés au design et aux études de chromophores ayant de grandes sections efficaces (σ), en particulier ceux qui possèdent des structures dipolaires^{15,16,17,18,19,20,21} et quadripolaires^{22,23,24,25,26,27}. Récemment, l'attention est plus particulièrement portée sur des structures multipolaires^{28, 29, 30}, branchées et conjuguées^{31,32,33}, comme les structures dendritiques^{34,35,36}.

¹⁵ Abboto A., Beverina L., Bozio R., Bradamante S., Ferrante C., Pagani G. A. and Signorini R. *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1963.

¹⁶ He G. S., Bhawalkar J. D., Zhao C. F. and Prasad P. N. *Appl. Phys. Lett.* **1995**, *67*, 2433.

¹⁷ Charier S., Ruel O., Baudin J.-B., Alcor D., Allemand J.-F., Meglio A. and Jullien L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4785.

¹⁸ He G. S., Yuan L., Cheng N., Bhawalkar J. D., Prasad P. N., Brott L. L., Clarson S. J. and Reinhardt B. A. *J. Opt. Soc. Am. B.* **1997**, *14*, 1079.

¹⁹ Reinhardt B. A., Brott L. L., Clarson S. J., Dillard A. G., Bhatt J. C., Kannan R., Yuan L., He G. S. and Prasad P. N. *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 1863.

²⁰ Belfield K. D., Hagan D. J., Van Stryland E. W., Schafer K. J. and Negres R. A. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1575.

²¹ Liu Z.-Q., Fang Q., Wang D., Cao D.-X., Xue G., Yu W.-L. and Lei H. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5047.

²² Ventelon L., Charier S., Moreaux L., Mertz J. and Blanchard-Desce M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2098.

²³ Mongin O., Porrès L., Moreaux L., Mertz J. and Blanchard-Desce M. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1495.

²⁴ Werts M. H. V., Gmouh S., Mongin O., Pons T. and Blanchard-Desce M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *16*, 4634.

²⁵ Chung S.-J., Rumi M., Alain V., Barlow S., Perry J. W. and Marder S. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10844.

²⁶ Mongin O., Porrès L., Charlot M., Katan C. and Blanchard-Desce M. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 1481.

²⁷ Katan C., Tretiak S., Werts M. H. V., Bain A. J., Marsh R. J., Leonczek N., Nicolaou N., Badaeva E., Mongin O. and Blanchard-Desce M. *J. Phys. Chem. B.* **2007**, *111*, 9468.

²⁸ He G. S., Swiatkiewicz J., Jiang Y., Prasad P. N., Reinhardt B. A., Tan J. H. and Kannan R. *J. Phys. Chem. A.* **2000**, *104*, 4805.

²⁹ Cho B. R., Son K. H., Lee S. H., Song Y.-S., Lee Y.-K., Jeon S.-J., Choi J. H., Lee H. and Cho M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10039.

³⁰ Beljonne D., Wenseleers W., Zojer E., Shuai Z., Vogel H., Pond S. J. K., Perry J. W., Marder S. R. and Brédas J.-L. *Adv. Funct. Mater.* **2002**, *12*, 631.

³¹ Le Droumaguet C., Mongin O., Werts M. H. V. and Blanchard-Desce M. *Chem. Commun.* **2005**, 2802.

³² Yoo J., Yang S. K., Jeong M.-Y., Ahn H. C., Jeon S.-J. and Cho B. R. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 645.

³³ Katan C., Terenziani F., Mongin O., Wertz M. H. V., Porrès L., Pons T., Mertz J., Tretiak S. and Blanchard-Desce M. *J. Phys. Chem. A.* **2005**, *109*, 3024.

³⁴ Drobizhev M., Karotki A., Rebane A. and Spangler C. W. *Opt. Lett.* **2001**, *26*, 1081.

³⁵ Mongin O., Brunel J., Porrès L. and Blanchard-Desce M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2813.

³⁶ Varnavski O., Yan X., Mongin O., Blanchard-Desce M. and Goodson III T. *J. Phys. Chem. C.* **2007**, *111*, 149.

Pour des applications en imagerie multiphotonique des systèmes biologiques, il est nécessaire de concevoir des fluorophores ayant à la fois un bon rendement quantique (Φ_f) et une grande section efficace (σ) dans le domaine spectral d'intérêt, c'est-à-dire de 700 nm à 1200 nm. Ceci permettrait d'augmenter le rapport signal/bruit en évitant les phénomènes d'autofluorescence et de réduire les photo-dommages grâce à des excitations moins énergétiques. De plus, la phototoxicité et la photostabilité sont également des critères très importants.

Les nanocristaux semiconducteurs, couramment appelés quantum dots (QDs), sont des nano-objets actuellement très "populaires" dans les applications en imagerie car ils possèdent des sections efficaces d'absorption à deux photons extrêmement grandes (σ jusqu'à 47.000 GM)³⁷, dépassant les fluorophores TPA moléculaires. De plus, ils offrent une large gamme spectrale de fluorescence et présentent des propriétés de photoluminescence robustes³⁸. Néanmoins, ces systèmes inorganiques présentent également de nombreux inconvénients tels que la toxicité pour l'environnement et la santé humaine, due en particulier à la présence des métaux lourds (par exemple Cd)^{39,40}.

Il serait donc intéressant de trouver des stratégies alternatives vers des substituts biocompatibles. Au sein de notre laboratoire, et en collaboration avec le laboratoire Synthèse et Electrosynthèse Organiques à l'Institut de Chimie de l'Université de Rennes I, nous avons récemment développé un concept particulièrement prometteur pour obtenir des nanodots entièrement organiques montrant une brillance comparable aux QDs⁴¹. Ce concept consiste en l'incorporation d'un grand nombre de fluorophores à deux photons ayant des sections efficaces significatives dans une seule et unique structure nanométrique et sphérique. Ce type de nanodots organiques peut être obtenu en greffant des fluorophores à deux photons (TP) à la

³⁷ Larson D. R., Zipfel W. R., Williams R. M., Clark S. W., Bruchez M. P., Wise F. W. and Webb W. W. *Science* **2003**, 300, 1434.

³⁸ Michalet X., Pinaud F. F., Bantolila L. A., Tsay J. M., Doose S., Li J. J., Sundarsun G., Wu A. M., Gambhir S. S. and Weiss S. *Science* **2005**, 307, 538.

³⁹ Hardman R. *Environ. Health Perspect.* **2006**, 114, 165.

⁴⁰ Mahendra S., Zhu H. Colvin V. L. and Alvarez P. J. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 9424.

⁴¹ Mongin O., Krishna T. R., Werts M. H. V., Caminade A.-M., Majoral J.-P. and Blanchard-Desce M. *Chem. Commun.* **2006**, 915.

surface d'une plateforme dendritique ou en les incorporant directement dans la structure dendritique si les caractéristiques chimiques du fluorophore le permettent. Cette stratégie offre de nombreux avantages potentiels : les caractéristiques de photoluminescence (PL) peuvent être modulées en jouant sur la nature des fluorophores utilisés, tandis que la structure dendritique sert à minimiser les effets toxiques et à contrôler la clairance (la capacité d'un organe à éliminer totalement une substance donnée d'un volume donné de plasma artériel par unité de temps)⁴². Néanmoins, l'incorporation des fluorophores dans les dendrimères impose la proximité de ces chromophores, ce qui favoriserait leur interaction et affecterait très probablement les caractéristiques photophysiques des nanodots. Par exemple, la formation de dimères ou d'agrégats par les fluorophores adjacents pourrait conduire à la désactivation de la fluorescence⁴³, ce qui a été le cas pour le dendrimère pérylène décrit dans le chapitre II. Par ailleurs, ces interactions à l'état excité peuvent provoquer des changements de propriétés PL liés à des phénomènes tels que le transfert d'énergie, la formation d'excimère ou l'annihilation des excitons qui est un processus important de décomposition des dendrimères contenant des chromophores à de hautes intensités d'excitation⁴⁴. Il a également été prouvé que l'influence des interactions entre les chromophores au sein du dendrimère sur les caractéristiques des réponses TPA est fortement dépendante non seulement de la nature des chromophores, mais aussi de leur environnement structural et de leurs orientations⁴⁵. C'est pour cette raison que nous avons construit et nous construisons encore au fur et à mesure une "banque" de nanodots organiques de générations différentes, de géométries et de structures différentes et qui possèdent des fluorophores à deux photons de nature différente, afin d'étudier le rôle de la structure dendritique dans la modulation des propriétés PL de ces nanodots organiques très prometteurs.

⁴² Maszewska M., Leclaire J., Cieslak M., Nawrot B., Okruszek A., Caminade A.-M. and Majoral J.-P. *Oligonucleotides* **2003**, 13, 193.

⁴³ West W. and Pearce S. J. *Phys. Chem.* **1965**, 69, 1894.

⁴⁴ De Belder G., Schweitzer G., Jordens S., Lor M., Mitra S., Hofkens J., De Feyter S., Van der Auweraer M., Herrmann A., Weil T., Müllen K. and De Schryver F. C. *ChemPhysChem*. **2001**, 2, 49.

⁴⁵ Mongin O., Pla-Quintana A., Terenziani F., Drouin D., Le Droumaguet C., Caminade A.-M., Majoral J.-P. and Blanchard-Desce M. *New Journal of Chemistry* **2007**, 31, 1354.

Dans ce chapitre, les synthèses de quelques nanodots organiques obtenus durant cette thèse sont décrites. Les caractérisations photophysiques de ces nanodots organiques ont été réalisées par nos collaborateurs dans le Laboratoire Synthèse et Electrosynthèse Organiques à l'Institut de Chimie de l'Université de Rennes I. En incorporant un fluorophore dans les branches dendritiques et en utilisant la méthodologie du dendrimère-PEG présentée dans le chapitre IV, nous avons réussi à synthétiser un dendrimère-PEG à absorption biphotonique, soluble à la fois dans les solvants organiques et dans l'eau. Les propriétés spectroscopiques et biologiques de ce nouveau dendrimère fluorescent hydrosoluble ont été étudiées par le Laboratoire de Biophysique Cellulaire à l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale à Toulouse.

5.2 Dendrimères biphoton et leurs propriétés photophysiques

5.2.1 Dendrimères ayant des fluorophores biphoton à la surface

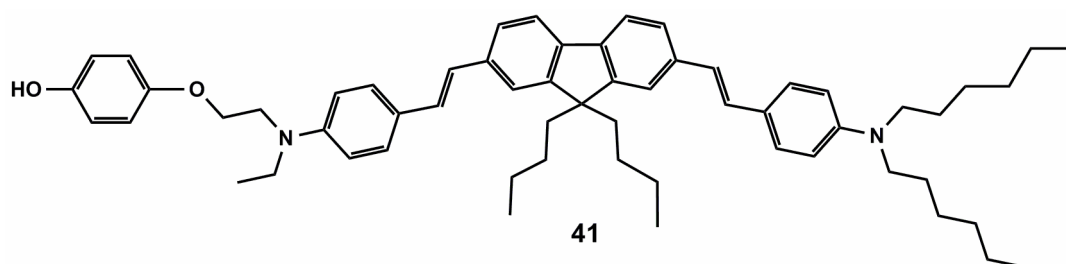


Figure 5-2 : Fluorophore à absorption biphotonique de surface

Afin d'étudier l'influence de la génération dendritique sur les propriétés photoluminescentes des nanodots organiques, le fluorophore **41** (cf. Figure 5-2) a été greffé à la surface des dendrimères phosphorés classiques de 2^{ème} et de 4^{ème} génération.

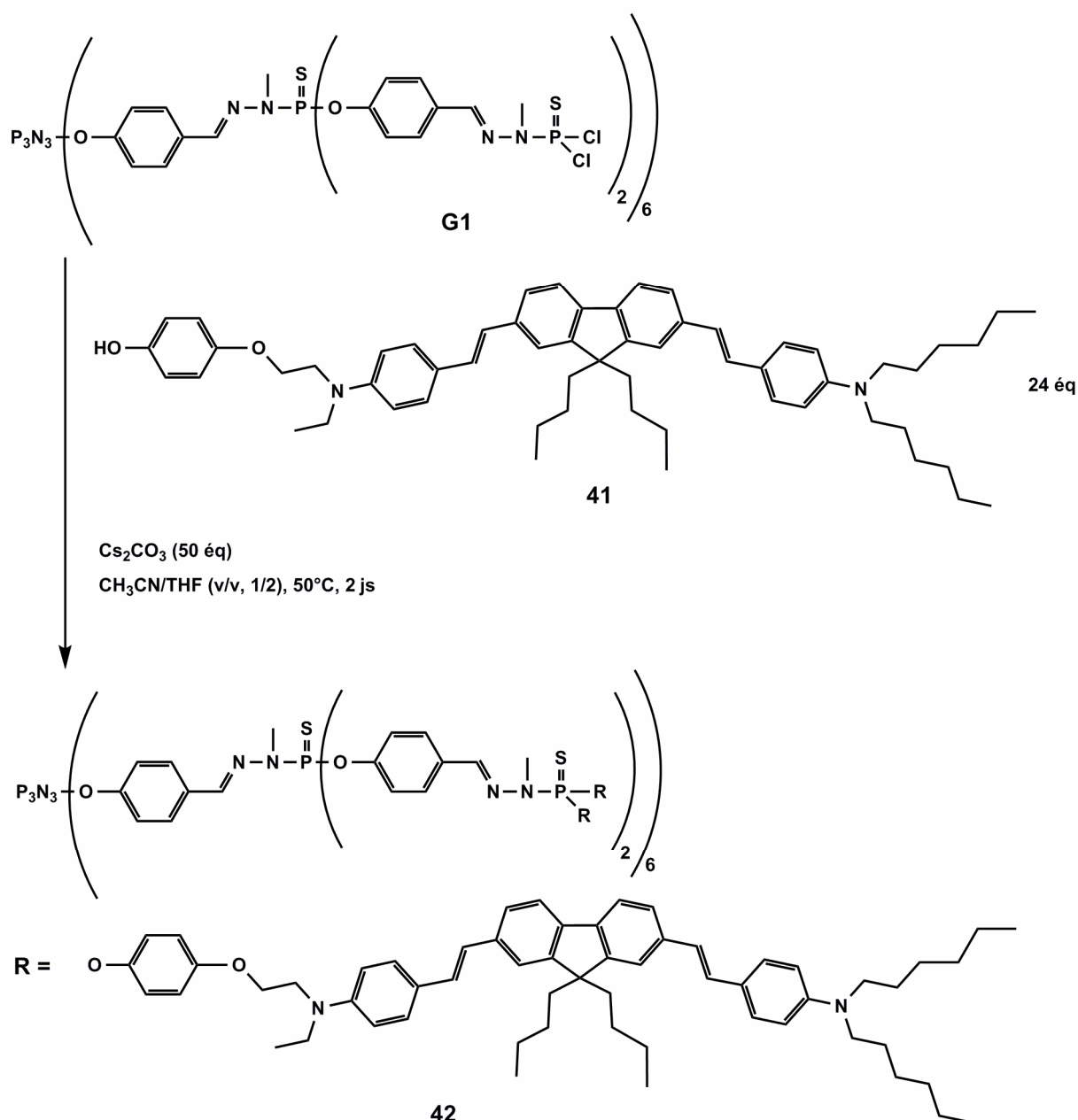


Figure 5-3 : Synthèse du dendrimère ayant 24 fluorophores

Le greffage du fluorophore **41** sur le dendrimère de 2^{ème} génération a été effectué dans un mélange de THF et d'acétonitrile distillés (2/1, v/v) à $50^\circ C$ (cf. Figure 5-3). L'acétonitrile est un solvant polaire au fort pouvoir dissociant, il est utilisé dans le but de faciliter la substitution nucléophile qui, dans notre cas, a tendance à être extrêmement lente. Dans ce cas précis, l'acétonitrile est préférable au diméthylformamide (DMF) et au diméthylsulfoxyde (DMSO) qui pourraient parfaitement convenir à ce type de réaction. En effet, le DMF et le DMSO ne sont pas faciles à éliminer à cause de leurs points d'ébullition élevés et de ce fait, ils complexifieraient la purification ultérieure. Néanmoins, la présence du THF est obligatoire

afin d'assurer une bonne solubilisation des produits. La réaction est contrôlée en RMN ^{31}P (CDCl_3) par la disparition du signal à 62,8 ppm correspondant aux groupements thiophosphine de surface au profit du signal à 64,5 ppm correspondant aux atomes de phosphores disubstitués en passant par le signal de la monosubstitution du groupement thiophosphine vers 69,6 ppm. Le produit brut a été purifié par précipitation dans un grand volume de pentane sans l'éther diéthylique puisque le produit d'intérêt est soluble dans ce dernier, pour donner le dendrimère **42** sous forme de solide jaune avec un rendement quasi-quantitatif.

Le greffage du fluorophore **41** a ensuite été réalisé sur un dendrimère de 4^{ème} génération et la réaction a été effectuée dans le THF distillé à 45°C en présence du carbonate de césium (cf. Figure 5-4). Plus la génération du dendrimère augmente, plus il devient susceptible de présenter des défauts de structure voire d'être dégradé, c'est pour cette raison que nous n'avons pas ajouté de solvant plus "fort" pour accélérer la réaction sur ce dendrimère de 4^{ème} génération. La RMN ^{31}P reste la meilleure méthode, par sa simplicité et sa rapidité, pour suivre l'avancement de la réaction. Un signal à 69,5 ppm (CDCl_3) correspondant à la mono-substitution apparaît au détriment du signal à 62,7 ppm (CDCl_3) correspondant aux groupements dichlorure de thiophosphine avant de redisparaître au profit du signal à 64,5 ppm (CDCl_3) correspondant à la di-substitution. Les signaux correspondant à la structure interne (atomes de phosphore dans les branches) du dendrimère se recouvrent, formant ainsi un seul signal large, et le signal correspondant au cœur triphosphazène ne se voit presque plus du fait de sa faible proportion dans la quantité totale des phosphores contenus dans le dendrimère.

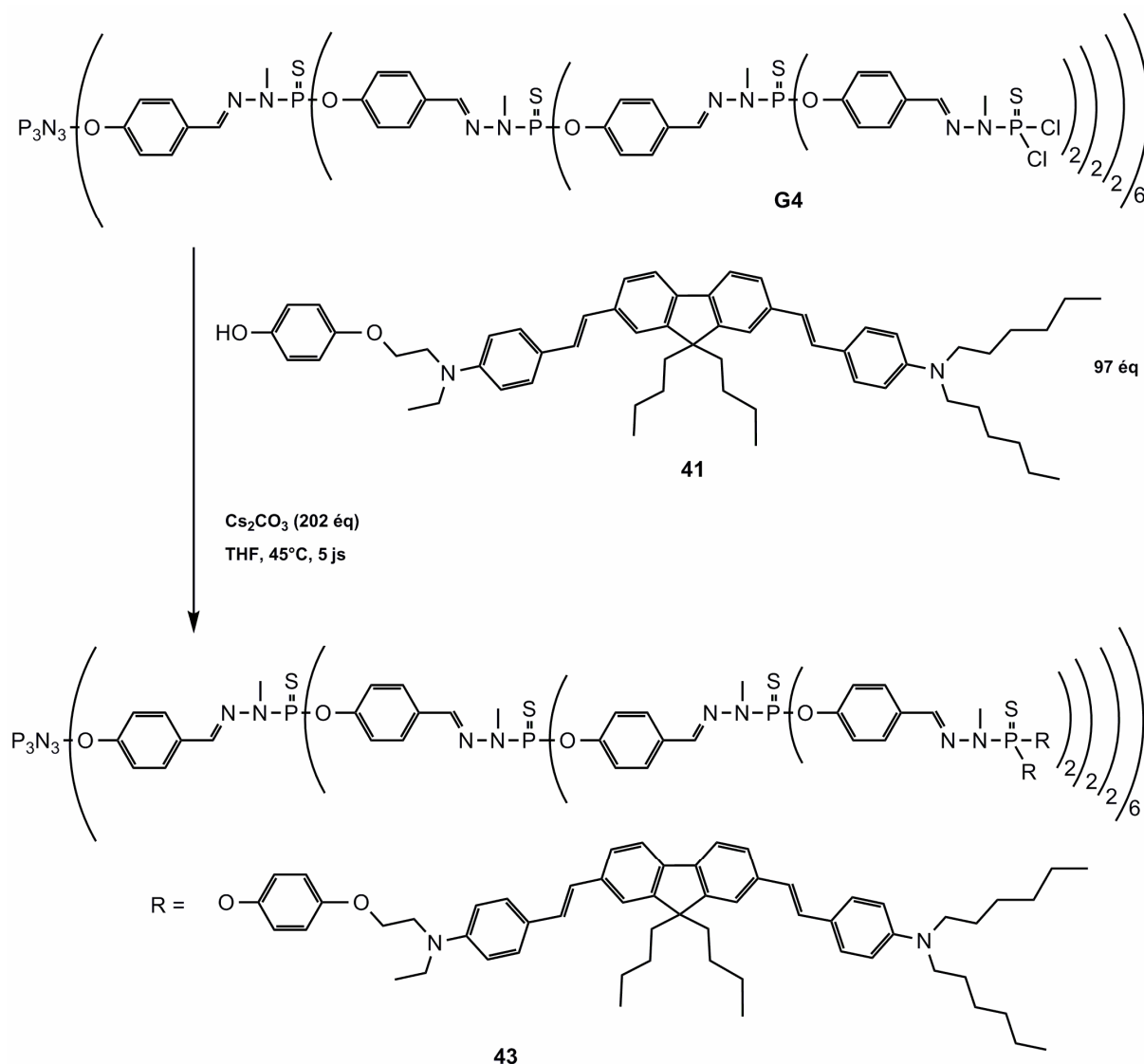


Figure 5-4 : Synthèse du dendrimère ayant 96 fluorophores

Si le greffage a été accompli sans difficultés particulières, la purification du produit a été en revanche laborieuse à cause d'un grand excès de monomère **41** à éliminer. En effet, au cours de la réaction, un épuisement des monomères dans le milieu réactionnel a été constaté par la CCM alors que le signal de la mono-substitution était clairement observé, probablement à cause d'une erreur de pesée au départ, une quantité supplémentaire (4 mg) de monomère **41** a dû être rajoutée pour terminer la réaction. Il se peut que cette quantité ait été trop importante par rapport à la quantité nécessaire, d'où l'excès important du monomère. La chromatographie sur colonne à gel de silice ou d'alumine n'est pas envisageable dans notre cas, car des tests sur CCM (silice et alumine) montrent que le dendrimère fluorescent reste solidement accroché à la silice ou à l'alumine quel que soit l'éluant utilisé. Une première

tentative de purification par précipitation traditionnelle dans le mélange pentane/éther diéthylique a permis d'obtenir très peu de produit pur, puisque l'éther diéthylique solubilisait non seulement parfaitement le monomère mais également le dendrimère à purifier. Etant donné la grande différence de taille entre le produit qui est un dendrimère de 4^{ème} génération (masse moléculaire : 100190 g/mol) et les monomères à séparer (masse moléculaire : 845 g/mol), une chromatographie sur colonne d'exclusion stérique a été choisie pour la séparation. Néanmoins, seulement très peu de fractions pures ont été obtenues, sans doute à cause des interactions très fortes entre le grand nombre (96 extrémités) de fluorophores à la surface et les monomères libres. Ces purifications à répétition ont enfin permis d'obtenir une quantité correcte (30 mg) de dendrimère **43** pour réaliser des études de propriétés photophysiques mais avec un rendement de seulement 24 %.

5.2.2 Dendrimère bicouche

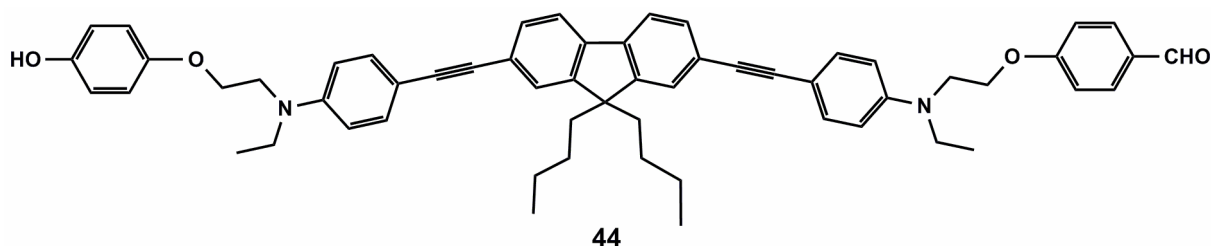


Figure 5-5 : Fluorophore à absorption biphotonique 44

Le fluorophore **44** (cf. Figure 5-5) synthétisé au sein de l'équipe Synthèse et Electrosynthèse Organique de l'Institut de Chimie à l'Université de Rennes I possède d'un côté une fonction phénol et de l'autre une fonction aldéhyde, ce qui lui permet d'être placé dans les branches du dendrimère. En effet, comme le 4-hydroxybenzaldéhyde, la fonction phénol du fluorophore **44** permet de réaliser la substitution nucléophile sur les extrémités thiophosphine et sa fonction aldéhyde est capable de réaliser la condensation avec le phosphorhydrazide pour permettre la croissance dendritique.

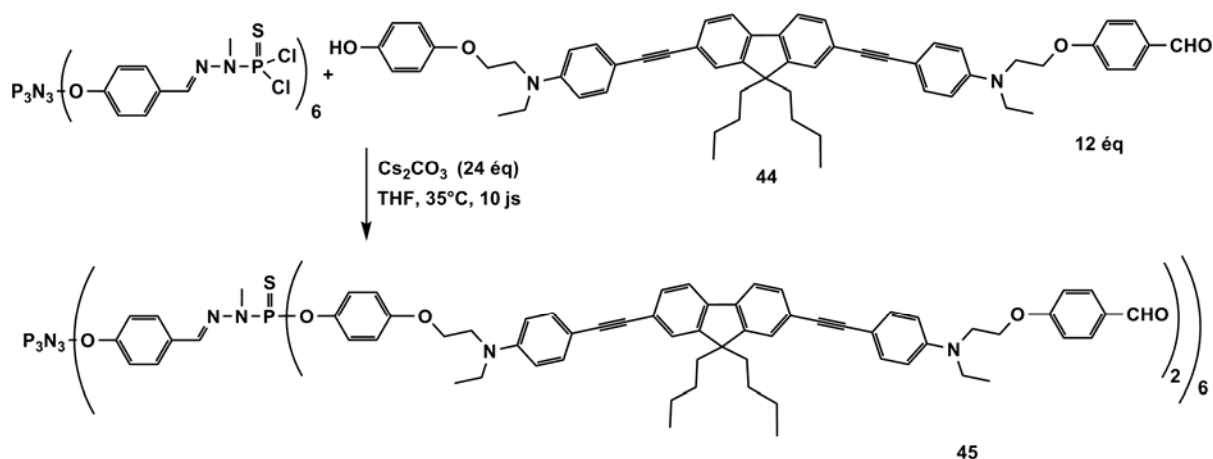


Figure 5-6 : Synthèse du dendrimère 45

La substitution nucléophile du fluorophore **44** sur les extrémités thiophosphine d'un dendrimère phosphoré de 1^{ère} génération se fait par la méthode classique, dans le tétrahydrofurane distillé en présence d'une base forte. Comme le fluorophore **41** et à la différence des substitutions habituelles qui se réalisent relativement rapidement, le greffage de ce fluorophore **44** s'avère plus difficile. La température de la réaction a été maintenue à 35°C pour favoriser la substitution (cf. Figure 5-6). L'avancement de la réaction est suivi par la RMN ^{31}P où les signaux correspondant respectivement à la mono-substitution (69,37 ppm dans le $CDCl_3$) et à la di-substitution (64,48 ppm dans le $CDCl_3$) évoluent tout au long de la réaction, mais extrêmement lentement vers la fin. La présence du monomère **44** libre, disponible pour la substitution peut être détectée par CCM (silice) par la présence d'une tache fluorescente au front de migration (éluant : acétone). La disparition complète du signal correspondant à la mono-substitution indique la fin de la réaction au bout de 10 jours d'agitation à 35°C. Le produit brut a d'abord été purifié par précipitation dans le mélange pentane/éther diéthylique, puis par chromatographie sur colonne à gel de silice. Le dendrimère **45** ayant des extrémités aldéhyde est obtenu avec un rendement de seulement 72% qui est relativement bas pour une étape de substitution nucléophile dans la chimie des dendrimères phosphorés. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le dendrimère **45** soit légèrement soluble dans l'éther, la précipitation dans le mélange pentane/éther diéthylique aurait donc causé une petite perte de produit.

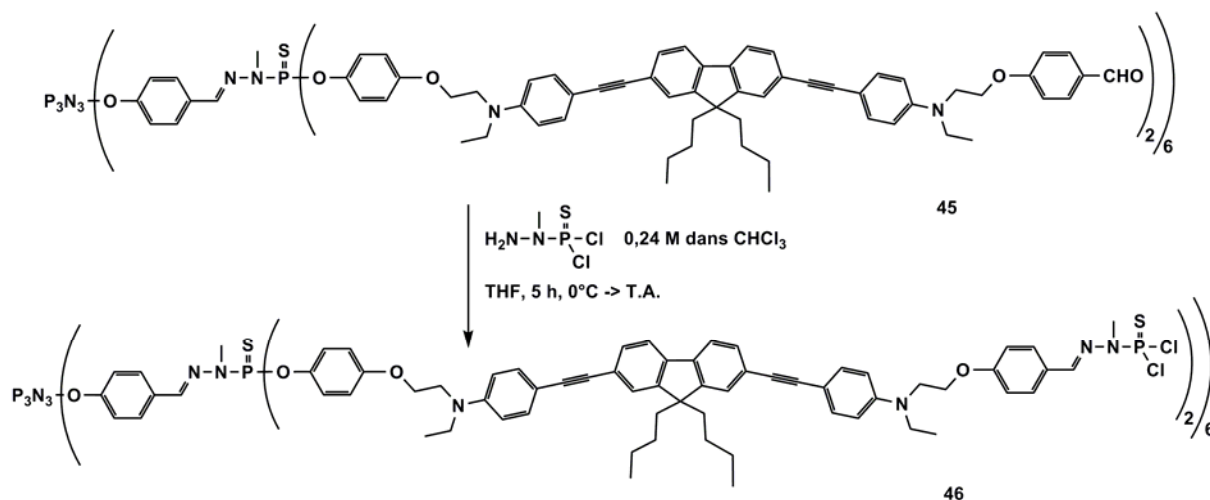


Figure 5-7 : Synthèse du dendrimère 46

Les extrémités aldéhyde du dendrimère **45** permettent de poursuivre la croissance dendritique selon la méthode classique (cf. Figure 5-7). Le dendrimère **45** est solubilisé dans le THF distillé et refroidi à 0°C à l'aide d'un bain de glace avant de recevoir le phosphorhydrazide qui est stocké en solution dans le chloroforme à la concentration de 0,24 M (cf. Chapitre II). La réaction se fait donc dans un mélange de solvant THF/Chloroforme. L'utilisation du THF a pour but d'accélérer la réaction de condensation dans ce cas. En effet, nous avons essayé précédemment d'utiliser uniquement le chloroforme comme solvant, la condensation du phosphorhydrazide sur cet aldéhyde a été extrêmement lente, voire même impossible à compléter. Cette condensation est suivie en RMN ^1H : la disparition complète du signal correspondant à l'aldéhyde (vers 10 ppm) indique la fin de la réaction. L'excès de phosphorhydrazide est éliminé par simple précipitation du dendrimère dans le mélange pentane/éther diéthylique. Le dendrimère **46** est obtenu avec un rendement quasi-quantitatif et est caractérisé en RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ dans le CDCl_3 par trois singulets, à 8,61 ppm correspondant aux phosphores du cœur, à 63,34 ppm correspondant aux phosphores de la surface et à 64,48 ppm correspondant aux phosphores de la 1^{ère} génération.

Une deuxième couche de fluorophore peut être ajoutée au dendrimère **46** par la substitution nucléophile des groupements thiophosphine à la surface par le fluorophore **41**. La réaction se fait en présence d'une quantité importante de carbonate de césium (50 équivalents pour 24 atomes de chlore) et dans un mélange de THF et d'acétonitrile distillés (2/1, v/v) à

50°C (cf. Figure 5-8) afin d'augmenter la cinétique de cette réaction de substitution nucléophile.

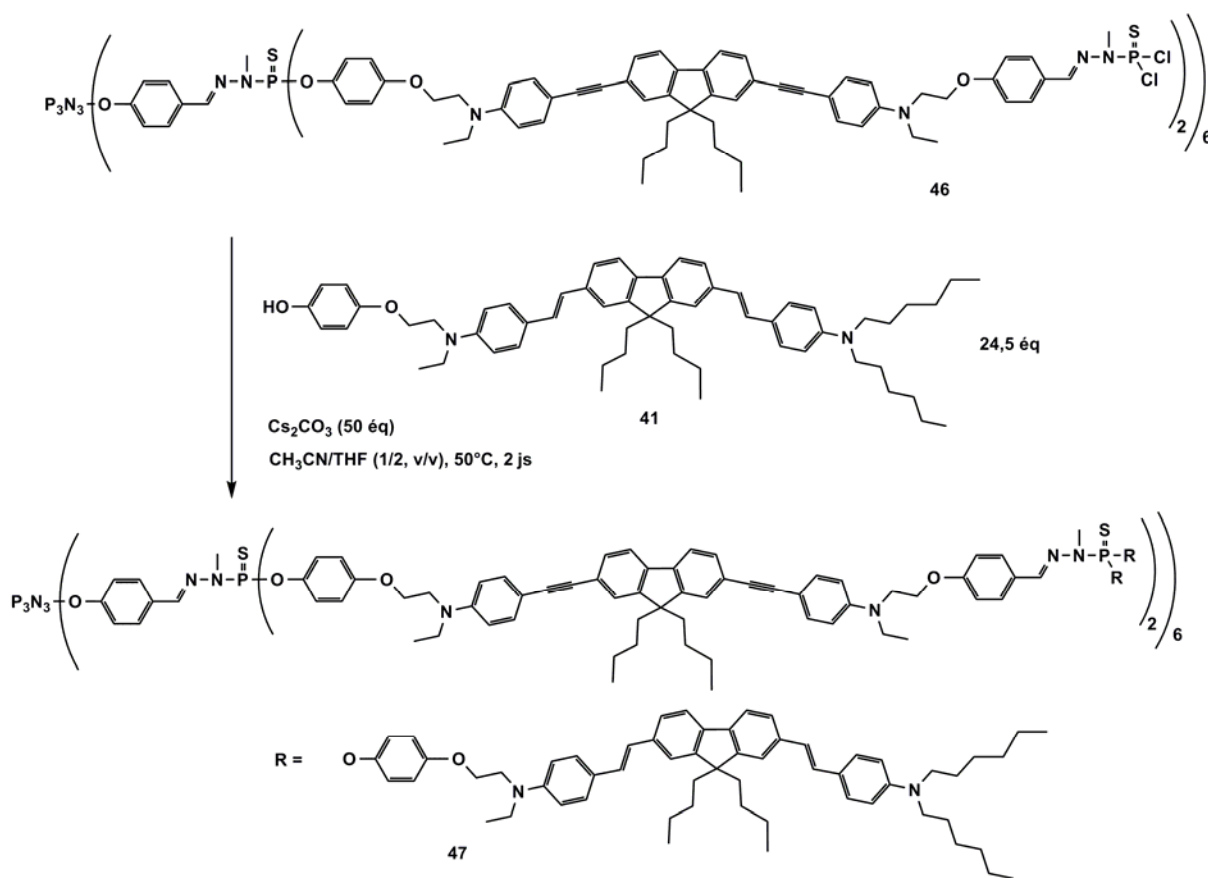


Figure 5-8 : Synthèse du dendrimère bicouche **47**

La réaction est suivie en RMN ^{31}P où la disparition du signal à 63,34 ppm au profit d'un signal à 64,39 ppm correspondant à la di-substitution du groupement thiophosphine en passant par un signal à 69,89 ppm correspondant à la mono-substitution indique l'accomplissement de la réaction. Le produit brut a d'abord été purifié par précipitation dans un mélange pentane/éther selon le mode opératoire habituel afin d'éliminer les monomères **41** en excès. Néanmoins, cette méthode n'a pas suffi à séparer tous les monomères des dendrimères, encore une fois, il semblerait que le dendrimère en question présente les mêmes affinités que le monomère vis-à-vis des solvants. Le produit brut a ensuite été purifié par chromatographie sur colonne d'exclusion stérique étant donné la différence de tailles conséquente entre le dendrimère (masse moléculaire : 32922 g/mol) et les monomères à séparer (masse moléculaire : 845 g/mol). Le dendrimère **47** a finalement été isolé sous forme

de solide jaune avec un rendement faible de 45 %. Il a été observé que ce dendrimère **47** en solution laisse un film jaune sur toutes les surfaces de contact en verre (tubes à hémolyse, ballons, piluliers, tubes RMN...), il est impossible de resolubiliser complètement ce film même après un traitement aux ultra-sons.

5.2.3 Propriétés photophysiques

Les études photophysiques de ces nanodots organiques ont été effectuées au sein du Laboratoire de Synthèse et Electrosynthèse Organiques de l'Institut de Chimie à l'Université de Rennes I. Toutes les expériences ont été réalisées dans le toluène par Youssef Mir.

5.2.3.1 Fluorophores biphotons en surface du dendrimère

Les caractéristiques de photoluminescence des dendrimères ayant le fluorophore **41** en surface ont d'abord été réalisées en absorption à un photon (cf. Tableau 5-1). Ces deux dendrimères montrent une absorption dans la région visible proche de l'ultraviolet. Le maximum d'absorption du dendrimère **42** (ayant 24 fluorophores à la surface) est quasiment identique à celui du fluorophore **41**, tandis que l'absorption maximale du dendrimère **43** (ayant 96 fluorophores à la surface) se déplace légèrement vers l'ultraviolet. Quant aux allures des spectres d'absorption, le dendrimère **42** (ayant 24 fluorophores) à la surface présente un spectre similaire à celui du fluorophore seul tandis que la courbe d'absorption du dendrimère **43** (ayant 96 fluorophores) à la surface est modifiée (cf. Figure 5-9). Ces observations montrent l'absence d'interactions notables entre ces fluorophores à l'état fondamental pour le dendrimère **42**, ce qui n'est pas le cas pour le dendrimère **43** qui a une densité de fluorophores plus importante à la surface. En effet, nous avons déjà vu dans le cas du dendrimère pérylène que le spectre d'absorption du dendrimère est fortement modifié par rapport au fluorophore pérylène seul à cause des interactions - qui ont provoqué la perte de fluorescence (cf. Chapitre II).

Tableau 5-1 : Etudes photophysiques du fluorophore 41 seul et en surface des dendrimères (2^{ème} et 4^{ème} générations) dans le toluène

Composé	Nb de F ^(a)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ (nm)	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{ém}}$ (nm)	Φ_f (ns)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{ADP(c)}}$ (nm)	$\lambda_{\text{2max}}^{\text{(d)}}$ GM
41	1	412,0	8,6E4	455	0,70 ^(b)	-	1418
42	24	412,5	2,3E6	465	0,49	1,07	35390
43	96	410,0	7E6	491,5	0,26	0,82	23280

(a) Nombre de fluorophores ; (b) Rendement de fluorescence réel ; (c) Absorption Deux Photons ; (d) 1 GM = 1E-50 cm⁴ s photon⁻¹.

Les résultats en fluorescence à absorption à un photon montrent que les deux dendrimères testés possèdent des maxima d'émission très différents l'un par rapport à l'autre, et également par rapport à celui du fluorophore seul, en particulier pour le dendrimère ayant 24 fluorophores à la surface. Ces observations permettent de suggérer des interactions fortes entre les fluorophores en surface à l'état excité, un phénomène qui pourrait également expliquer la baisse des rendements quantiques avec l'augmentation du nombre de fluorophores sur le dendrimère (cf. Tableau 5-1). Les temps de demi-vie de fluorescence des deux dendrimères ont été déterminés respectivement à 1,07 ns pour le dendrimère **42** (24 fluorophores) et à 0,82 ns pour le dendrimère **43** (96 fluorophores).

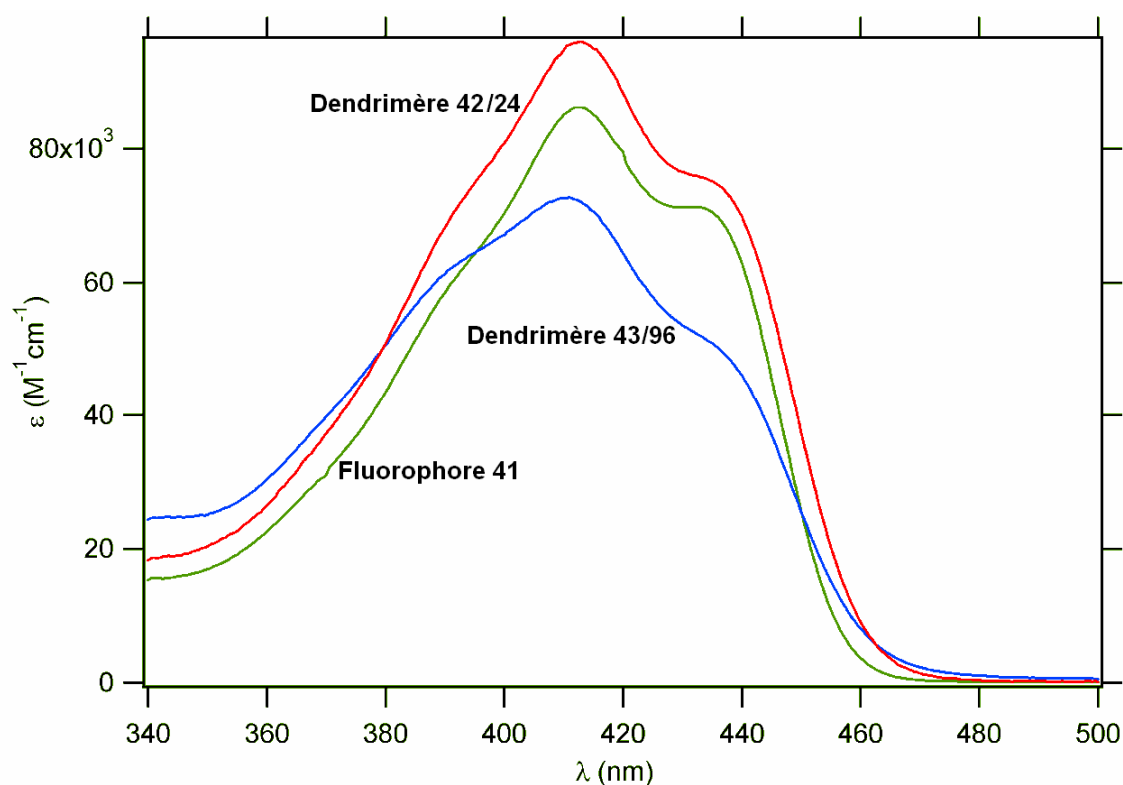


Figure 5-9 : Spectres d'absorption du fluorophore 41 seul et sur dendrimères de 2^{ème} et 4^{ème} génération

Les études d'absorption biphotonique des dendrimères ont été réalisées par études de la fluorescence à excitation à deux photons (TPEF pour two-photon-excited fluorescence) de ces dendrimères dans le toluène. Cette technique permet d'accéder directement à la section efficace, le paramètre déterminant pour les applications en imagerie d'un outil fluorescent. Dans le cas du dendrimère ayant 24 fluorophores à la surface, la section efficace est comparable à celle du fluorophore seul multipliée par 24, ce qui confirme l'absence d'interactions entre les fluorophores à la surface du dendrimère. Néanmoins, la section efficace mesurée pour le dendrimère ayant 96 fluorophores à la surface est nettement plus basse que celle du fluorophore seul multipliée par 96, résultat probablement dû aux interactions entre les fluorophores à sa surface à l'état fondamental.

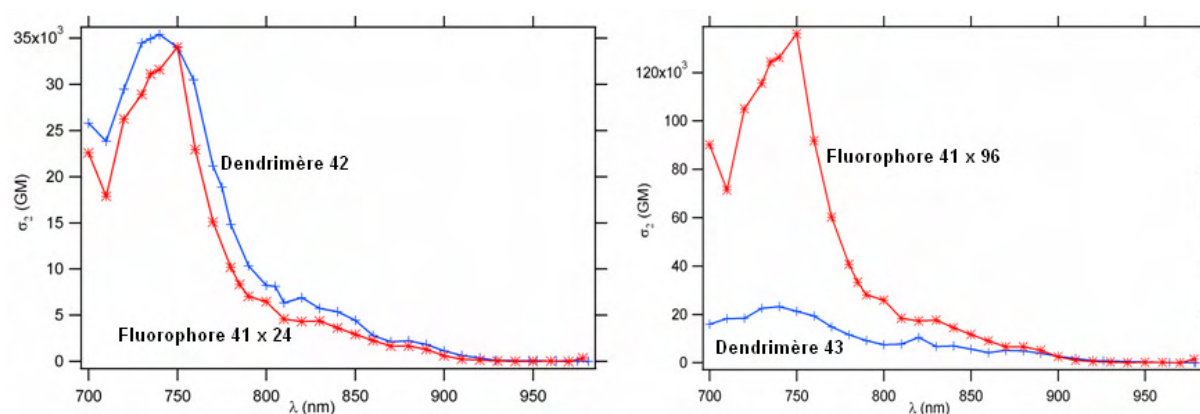


Figure 5-10 : Comparaison des spectres d'absorption biphotonique du fluorophore et des dendrimères 42 et 43. Gauche : dendrimère 42 et fluorophore x 24 ; Droite : dendrimère 43 et fluorophore x 96

5.2.3.2 Dendrimère bicouche

Le dendrimère **47** possédant deux couches de fluorophores différentes (12 fluorophores **44** à la première couche et 24 fluorophores **41** à la surface) a d'abord été étudié en absorption à un photo dans le toluène (cf. Figure 5-11). Il est caractérisé par une absorption maximale à 405 nm ($\epsilon = 1,3\text{E}6 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et une émission maximale à 460 nm ($\Phi_f = 0,24$) (cf. Tableau 5-2). Cette longueur d'onde d'émission maximale est plus proche de la longueur d'onde d'émission du fluorophore **41** (cf. Tableau 5-2), c'est-à-dire le fluorophore à la surface du dendrimère, ce qui montre que le transfert d'énergie du fluorophore **44** (dans les branches) au fluorophore **41** (à la surface) a été total (cf. Figure 5-12).

Tableau 5-2 : Etudes photophysiques du dendrimère bicouche 47 dans le toluène

Composé	Nb de F ^(a)	$\epsilon_{\text{max}}^{\text{abs}}$		$\epsilon_{\text{max}}^{\text{ém}}$	Φ_f	(ns)
		(nm)	($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	(nm)		
44	1	412	8,6E4	487	0,70 ^(b)	-
41	1	386	8,5E4	420	0,83	-
47	12x 44 + 24x 41	406	1,3E6	460	0,24	0,82

(a) Nombre de fluorophores ; (b) Rendement de fluorescence réel.

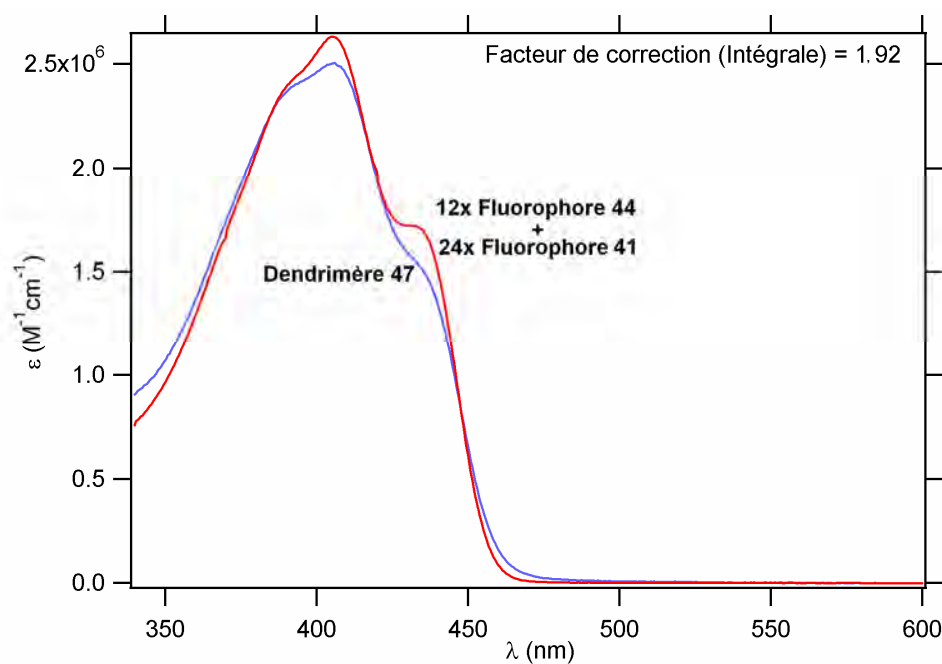


Figure 5-11 : Spectres d'absorption biphotonique du dendrimère bicouche et de la somme des fluorophores contenus dans la structure dendritique

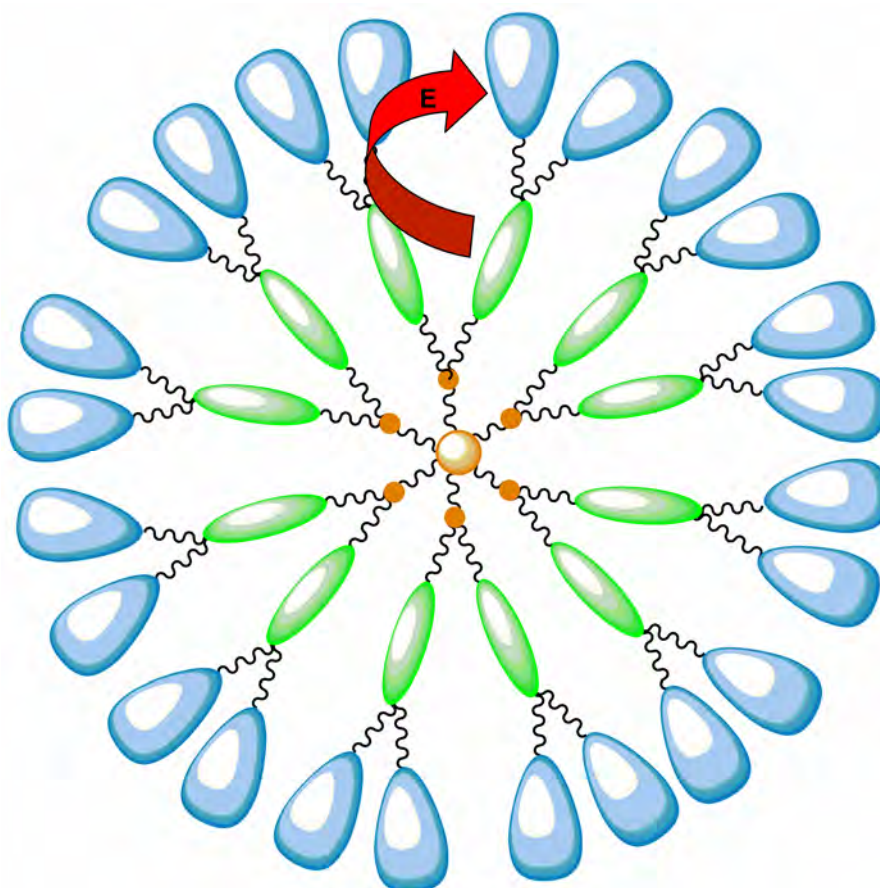


Figure 5-12 : Transfert d'énergie du fluorophore de la première couche au fluorophore de la deuxième couche

5.3 Dendrimère-PEG à absorption biphotonique et ses propriétés

5.3.1 Synthèse du dendrimère-PEG à absorption biphotonique

Sur le dendrimère **46**, 24 équivalents de MeO-PEG₁₇-Phénol, composé **41** (cf. Chapitre IV) ont été greffés selon le mode opératoire traditionnel (cf. Figure 5-13). Le suivi réactionnel a été réalisé en RMN ³¹P (CDCl₃) par le déplacement du signal correspondant aux phosphores de la périphérie (de 63,3 à 64,7 ppm). Le produit brut a été purifié par précipitation dans l'éther diéthylique à froid puis par chromatographie sur colonne d'exclusion stérique pour donner le dendrimère **48**. L'introduction des PEG sur ce dendrimère a pour but de le rendre soluble dans l'eau et de pouvoir étudier les propriétés photophysiques de ce nanodot organique dans un milieu proche des environnements biologiques. Néanmoins, il a été observé que ce dendrimère **48** n'est pas directement soluble dans l'eau. Il est nécessaire de le solubiliser dans un minimum de DMSO ou DMF avant de diluer avec de l'eau. Cette observation n'est cependant pas étonnante, la proportion de la partie hydrophobe de la structure dendritique étant très grande, il faudrait sans-doute utiliser des PEG de plus grande longueur. Il a été démontré par des expériences préliminaires réalisées au sein de notre laboratoire que l'apport de la solubilité par les PEG dépend surtout de la longueur de chaîne de ces derniers plutôt que de la quantité.

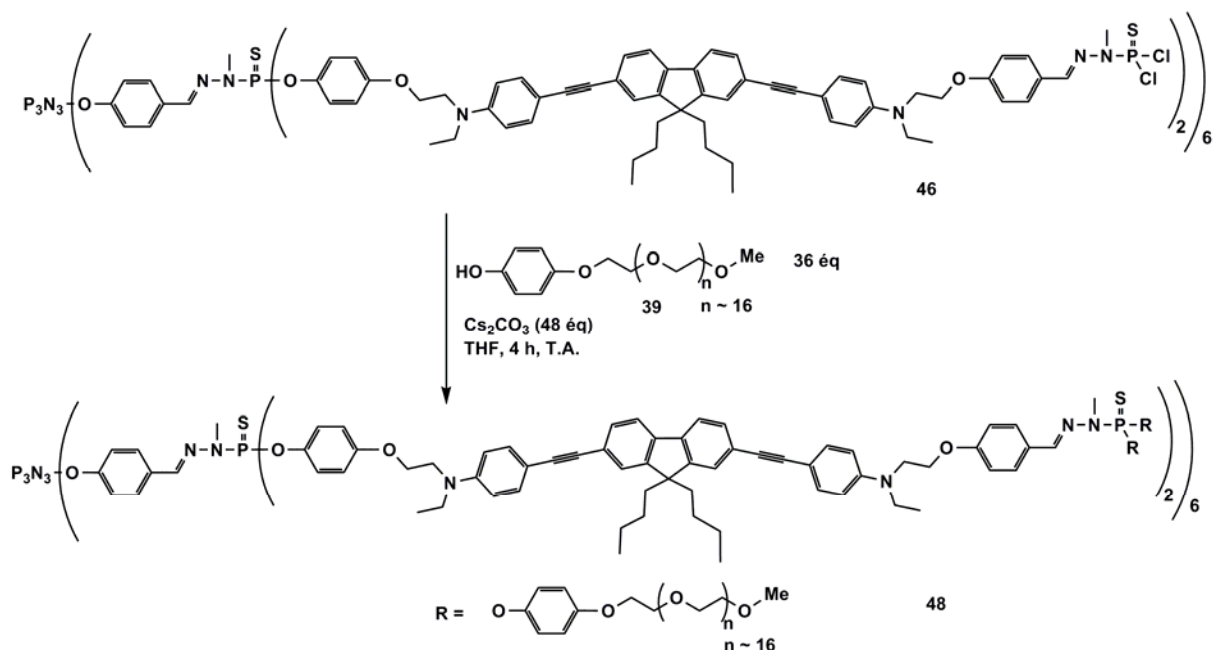


Figure 5-13 : Synthèse d'un nanodot dendritique ayant des polyéthylène glycol en surface

5.3.2 Imagerie du dendrimère-PEG à absorption biphotonique

5.3.2.1 Etudes spectroscopiques préliminaires

Les études photophysiques approfondies de ce dendrimère-PEG à absorption biphotonique dans les solvants organiques et dans l'eau sont actuellement en cours au Laboratoire de Synthèse et Electrosynthèse Organiques à l'Institut de Chimie à l'Université de Rennes. Cependant, les études spectroscopiques préliminaires ainsi que l'imagerie par fluorescence à excitation biphotonique de ce nouveau dendrimère fluorescent hydrosoluble ont pu être réalisées au Laboratoire de Biophysique Cellulaire à l'IPBS à Toulouse par Aurélie Paganin et Muriel Golzio et montrent des résultats intéressants. Elles ont également effectué tous les tests biologiques.

Les caractéristiques spectroscopiques de ce dendrimère fluorescent **48** en absorption monophotonique ont été déterminées dans un solvant aqueux (tampon phosphate pH 7,4) et également dans un solvant organique (le DMF). Le dendrimère **48** présente une capacité d'absorption à 387 nm, la longueur d'onde maximale d'absorption pour les deux solutions, quasiment deux fois plus grande dans le DMF ($\epsilon = 585.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) que dans le PBS ($\epsilon =$

$312.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). En termes de fluorescence, l'intensité de fluorescence du dendrimère dans le DMF (2.000.000 coups) est 4 fois plus importante que celle du dendrimère dans le PBS (500.000 coups) pour une concentration de $1,54 \text{ M}$. Même si les valeurs de rendements quantiques absolues ne sont pas déterminées, ces observations préliminaires nous permettent de conclure que la fluorescence du dendrimère **48** est affectée par la présence d'eau de manière significative.

5.3.2.2 Toxicité cellulaire

Une lignée cellulaire B16F10-GFPC44 (exprimant la protéine fluorescente verte) a été incubée pendant 24 heures avec le dendrimère **48** à la concentration de 77 M . Aucun changement de morphologie n'a été observé en imagerie microscopique que ce soit en mode contraste de phase ou en utilisant un filtre GFP (cf. Figure 5-14). Ceci laisse supposer que le dendrimère n'a pas d'effets toxiques sur cette lignée cellulaire, mais des tests de toxicités quantitatives telles que le test MTT seront nécessaires pour confirmer l'absence de cytotoxicité de ce dendrimère.

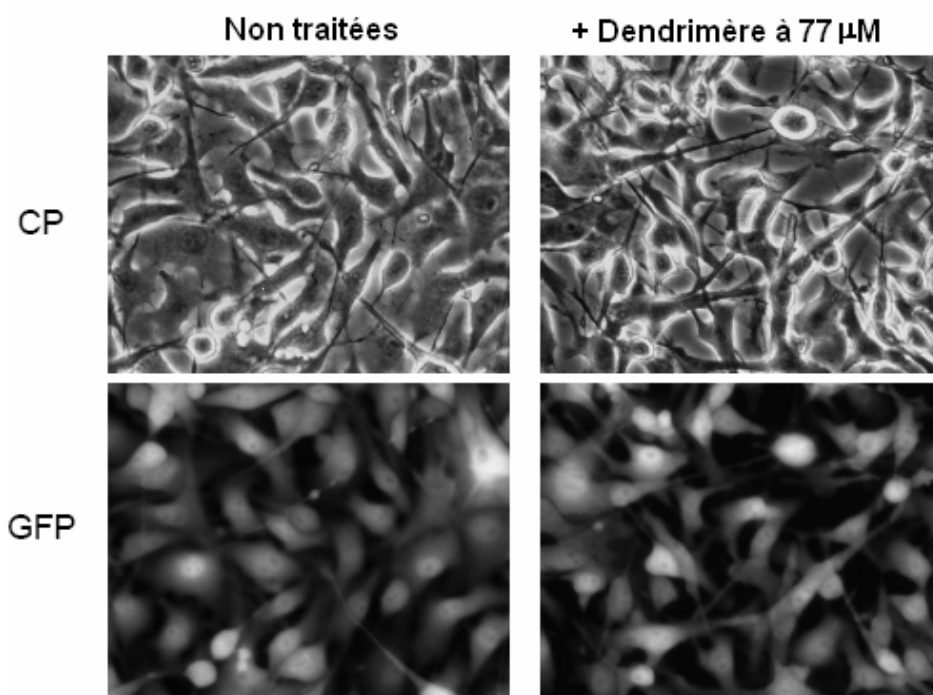


Figure 5-14 : Imagerie microscopique des cellules B16F10-GFPC44. Gauche : cellules non traitées ; Droite : cellules après 24 heures d'incubation avec le dendrimère à 77 M . Haut : images en contraste de phase ; Bas : images avec le filtre GFP

5.3.2.3 Imagerie en microscopie à absorption biphotonique

Une solution de dendrimère **48** dans le PBS contenant 10 % de DMF a été ajoutée au milieu de culture des cellules B16F10-GFP afin d'avoir une concentration finale en dendrimère de $154 \text{ } \mu\text{M}$ et le tout a été observé au microscope à absorption biphotonique. Lors d'un premier scan, aucune fluorescence n'a été détectée. Après le deuxième scan, une concentration de fluorescence est observée autour des cellules et uniquement dans la zone irradiée par le laser d'excitation (cf. Figure 5-15). Cette concentration des dendrimères autour des cellules montre que les dendrimères ont tendance à interagir avec les membranes cellulaires. D'après ces observations, il semblerait que les dendrimères dans le milieu de culture forment des agrégats de forte fluorescence sous l'effet de l'irradiation du laser qui aurait éventuellement induit un changement de conformation de la structure dendritique.

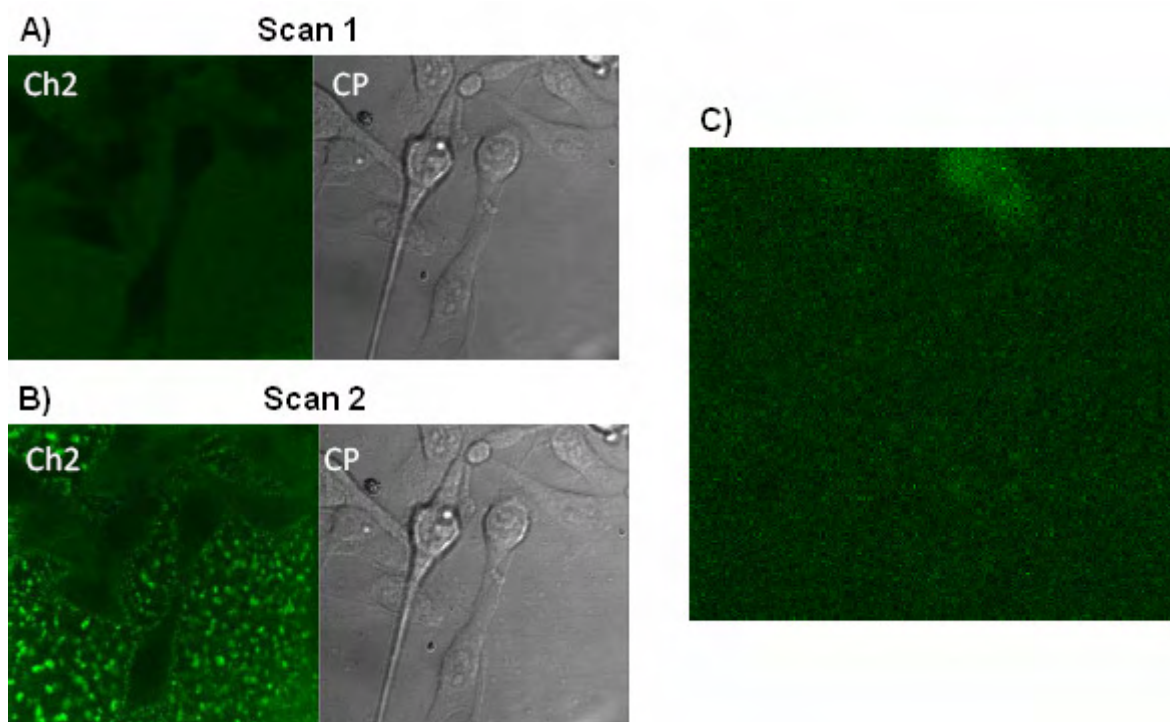


Figure 5-15 : Imagerie en microscopie à absorption biphotonique (Ch2) du milieu de culture en présence du dendrimère à $154 \text{ } \mu\text{M}$. A) après un premier scan ; B) après un deuxième scan ; C) espace intercellulaire (CP : microscopie à contraste de phase).

Le dendrimère a ensuite été solubilisé dans le PBS contenant 10 % de DMF en absence de cellules à la même concentration que lors de l'expérience précédente ($154 \text{ } \mu\text{M}$) et a été observé en microscopie à absorption biphotonique. Après 30 scans sur une même zone

d'irradiation, une forte intensité de fluorescence apparaît et uniquement dans cette zone irradiée (cf. Figure 5-16, A) et B)). Cette augmentation de fluorescence dans les régions irradiées persiste pendant plusieurs minutes, ainsi, il a été possible d'"écrire" dans l'eau tout simplement en irradiant les zones désirées. Cette observation est certainement due à la structure particulière de ce dendrimère. En effet, la solubilité dans l'eau du dendrimère **48** ayant une structure interne hydrophobe est assurée par les liaisons hydrogènes établies entre les chaînes de polyéthylène glycol à sa surface et les molécules d'eau. Ces interactions fortes permettant la solubilisation peuvent être perturbées par des facteurs extérieurs tels que la lumière ou la chaleur, provoquant ainsi un changement de conformation du dendrimère qui pourrait conduire à un changement de propriétés photophysiques observées. En effet, le polyéthylène glycol présente des propriétés thermosensibles en milieux aqueux, il a été montré qu'il existe une température critique à laquelle le polyéthylène glycol s'effondre sur lui-même du fait de la rupture (ou de l'affaiblissement) des liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau et les groupements polaires, provoquée par une température trop élevée⁴⁶. Pour la solution du dendrimère dans le DMF à la même concentration (154 μ M), la fluorescence reste homogène partout dans la solution (cf. Figure 5-16, C) et D)), du fait sans doute d'une meilleure solvation de la structure en entier.

⁴⁶ Thèse Jérôme Roeser **2008**, Strasbourg

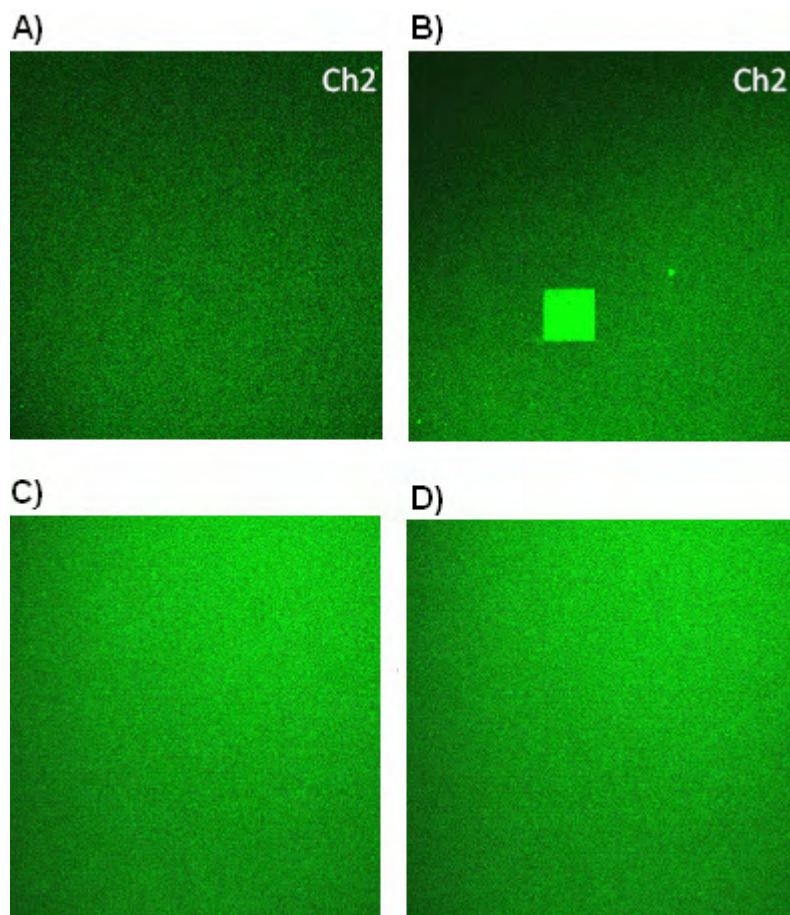


Figure 5-16 : Effet de l'irradiation laser sur la fluorescence du dendrimère seul (concentration : $154 \text{ } \mu\text{M}$) dans le PBS contenant 10 % de DMF et dans le DMF pur. A) Dendrimère dans le PBS contenant 10 % de DMF après un scan ; B) Dendrimère dans le PBS contenant 10 % de DMF après 30 scans ; C) Dendrimère dans le DMF après un scan ; D) Dendrimère dans le DMF après 30 scans.

Le laser d'irradiation est à la fois une source de photons et une source de chaleur. Afin de déterminer le facteur provoquant cette hausse de fluorescence locale en solution aqueuse du dendrimère **48**, deux solutions de dendrimère ($154 \text{ } \mu\text{M}$) dans le PBS contenant 10 % de DMF et dans le DMF seul ont été chauffées au bain-marie à 90°C pendant 10 minutes, puis mises au contact avec les cellules B16F10-GFP après le refroidissement, le même phénomène a été observé en microscopie à absorption biphotonique (cf. Figure 5-17). Néanmoins, la formation des clusters fluorescents semble irréversible sous l'effet thermique puisque ces clusters de fluorescence ont été observés après refroidissement à la température ambiante des solutions de dendrimères.

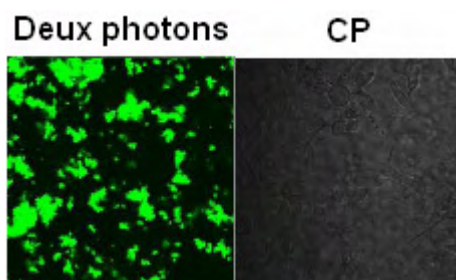


Figure 5-17 : Image en microscopie à absorption biphotonique des dendrimères dans le milieu de culture après un cycle de chauffage à 90°C au bain-marie pendant 10 minutes

Afin d'obtenir des informations plus précises sur la nature de ces clusters fluorescents et sur le comportement de ce nouveau dendrimère fluorescent hydrosoluble sous l'effet thermique, d'autres expériences doivent être effectuées notamment l'étude de la variation du coefficient de diffusion de ce dendrimère dans l'eau en fonction de la température en RMN par la technique de DOSY. En effet, cette hausse locale de fluorescence observée peut être due à deux phénomènes différents qui peuvent aussi se combiner : soit les chaînes PEG en surface se replient sur le dendrimère sous l'effet thermique et permettent ainsi de mieux isoler les fluorophores dans les branches dendritiques de l'environnement extérieur aqueux, ce qui conduit à une hausse de fluorescence ; soit les dendrimères interagissent entre eux sous l'effet de la chaleur, formant ainsi des agrégats fluorescents. Les expériences de diffusion en RMN sont en cours et nous permettront probablement une meilleure compréhension de ce phénomène intéressant.

5.4 Conclusion

Deux dendrimères phosphorés de 2^{ème} et de 4^{ème} générations possédant respectivement 24 et 96 fluorophores à absorption biphotonique à la surface ont été synthétisés afin d'étudier l'influence de la génération sur les propriétés photoluminescentes des nanodots organiques. Il a été montré que le dendrimère ayant 24 fluorophores possède une section efficace équivalente à la somme des sections efficaces des 24 fluorophores seuls, tandis que le dendrimère ayant 96 fluorophores présente une section efficace nettement moins importante que la somme des sections efficaces de ces 96 fluorophores seuls et également moins importante que le dendrimère avec seulement 24 fluorophores. Ceci pourrait s'expliquer par

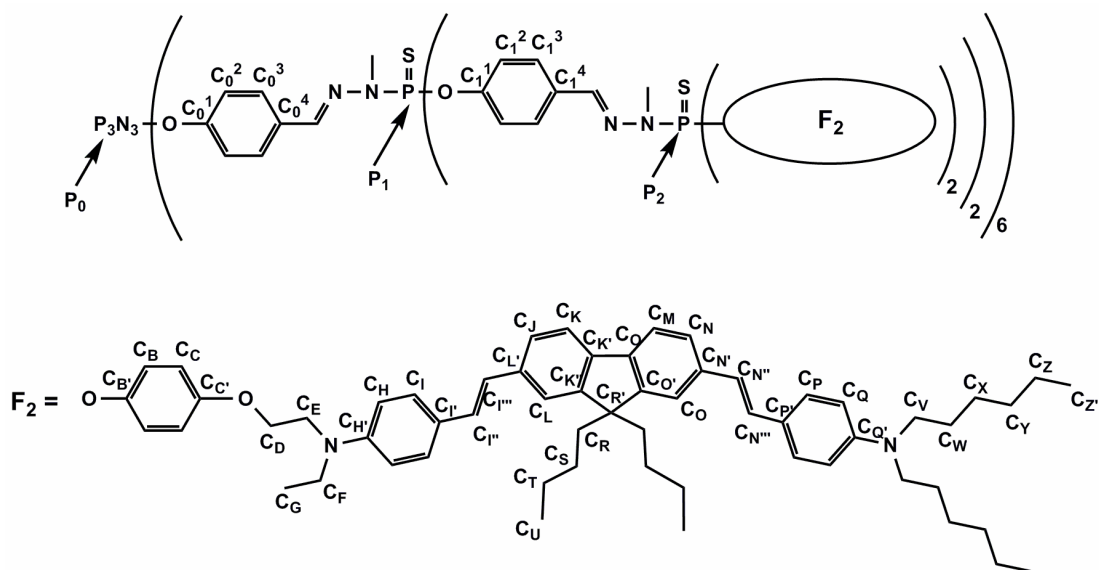
de fortes interactions à l'état fondamental entre les fluorophores à la surface du dendrimère de 4^{ème} génération.

Un dendrimère à absorption biphotonique ayant deux types de fluorophores respectivement dans les branches et en surface a également été synthétisé. Les résultats photophysiques ont montré que le transfert d'énergie des fluorophores dans les branches à ceux en surface a été total.

En incorporant des fluorophores à absorption biphotonique dans les branches d'un dendrimère et en greffant des chaînes polyéthylène glycol décrites dans le chapitre IV à la surface, le premier dendrimère phosphoré fluorescent hydrosoluble et neutre a été obtenu. Il ne semble pas causer des problèmes de cytotoxicité d'après les expériences préliminaires qualitatives, mais ce résultat reste à confirmer par des tests de cytotoxicité quantitatifs. La formation de clusters fluorescents en microscopie à absorption biphotonique sous l'effet de l'irradiation de ce dendrimère a été observée et ce dernier semble interagir avec les membranes cellulaires. Des expériences de diffusion en RMN sont en cours et pourraient permettre une meilleure compréhension du phénomène.

5.5 Partie expérimentale

Les composés **41** et **44** nous ont été fournis par l'équipe de Mireille Blanchard-Desce à Rennes.

Composé 42 :

A une solution de dendrimère de 2^{ème} génération **G2** (5 mg, 1,04 mol) et de fluorophore **41** (21 mg, 25 mol) dans le mélange THF/acétonitrile distillés (2 mL/1 mL), a été ajouté le carbonate de césium (17 mg, 52,6 mol). Le mélange réactionnel a été agité à 50°C pendant 2 jours, centrifugé pour enlever le sel formé et le solvant évaporé. Le produit brut a été purifié par précipitation dans le pentane (x 3) pour donner le dendrimère **42** sous forme de solide jaune (rendement quasi-quantitatif).

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz) : = 8,61 (s, P_0), 62,41 (s, P_1), 64,77 (s, P_2) ppm.

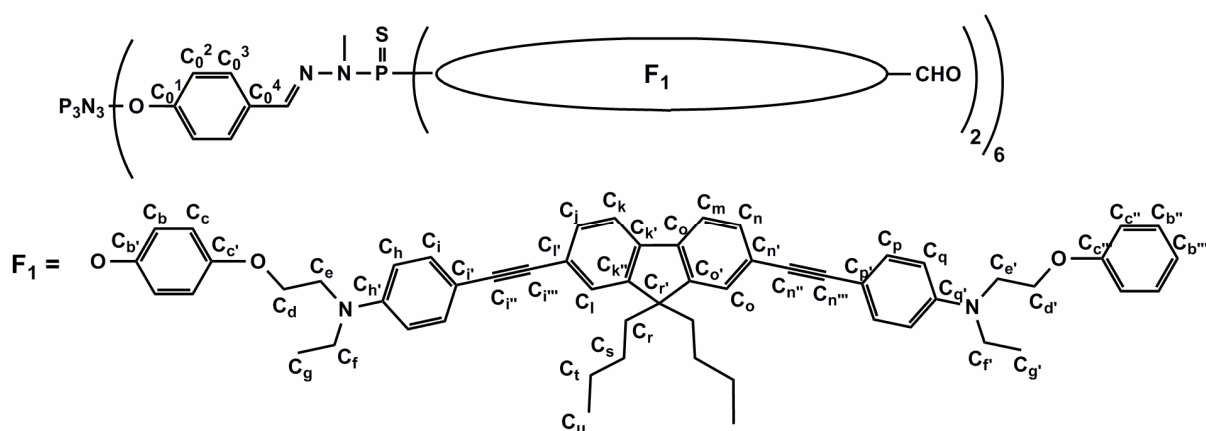
RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz) : = 0,55 – 0,80 (m, 240H, C_S -H, C_U -H), 0,91 (m, 144H, C_Z -H), 1,00 – 1,20 (m, 168H, C_T -H, C_G -H), 1,20 – 1,45 (m, 288H, C_X -H, C_Y -H, C_Z -H), 1,61 (sl, 96H, C_W -H), 2,00 (sl, 96H, C_R -H), 3,10 – 3,48 (m, 198H, P_1 -N-CH $_3$, P_2 -N-CH $_3$, C_V -H, C_F -H), 3,61 (sl, 48H, C_E -H), 3,96 (sl, 48H, C_D -H), 6,50 – 6,72 (m, 144H, C_Q -H, C_H -H, C_C -H), 6,80 – 7,28 (m, 180H, C_B -H, C_1^2 -H, C_0^2 -H, C_1^3 -H, C_1^4 -H, C_N^3 -H, C_N^4 -H), 7,28 – 7,50 (m, 210H, C_I -H, C_P -H, C_L -H, C_O -H, C_J -H, C_N -H, $\text{CH}=\text{N}-\text{NCH}_3$ - P_1 , $\text{CH}=\text{N}-\text{NCH}_3$ - P_2), 7,50 – 7,80 (m, 84H, C_0^3 -H, C_1^3 -H, C_K -H, C_M -H) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz) : = 12,34 (s, C_G), 13,86 (s, C_U), 14,07 (s, C_Z), 22,71 (s, C_Z), 23,15 (s, C_T), 25,99 (s, C_S), 26,87 (s, C_X), 27,33 (s, C_W), 31,75 (s, C_Y), 32,95 (sl, P_1 -N-CH $_3$, P_2 -N-CH $_3$), 40,45 (s, C_R), 45,63 (s, C_F), 49,50 (s, C_E), 51,08 (s, C_V), 53,43 (s, C_R),

$\underline{\text{CH}}=\text{N}-\text{NCH}_3\text{-P}_2$, $\underline{\text{CH}}=\text{N}-\text{NCH}_3\text{-P}_3$, $\underline{\text{CH}}=\text{N}-\text{NCH}_3\text{-P}_4$), 7,50 – 7,78 (m, 372H, $\text{C}_0^3\text{-H}$, $\text{C}_1^3\text{-H}$, $\text{C}_2^3\text{-H}$, $\text{C}_3^3\text{-H}$, $\text{C}_\text{K}\text{-H}$, $\text{C}_\text{M}\text{-H}$) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz) : = 12,36 (s, C_G), 13,87 (s, C_U), 14,09 (s, C_Z), 22,71 (s, C_Z), 23,15 (s, C_T), 26,00 (s, C_S), 26,87 (s, C_X), 27,34 (s, C_W), 31,75 (s, C_Y), 32,95 (sl, $\text{P}_1\text{-N-CH}_3$, $\text{P}_2\text{-N-CH}_3$, $\text{P}_3\text{-N-CH}_3$, $\text{P}_4\text{-N-CH}_3$), 40,47 (s, C_R), 45,63 (sl, C_F), 49,50 (sl, C_E), 51,08 (s, C_V), 53,43 (s, C_R'), 65,82 (s, C_D), 111,68, 111,83 (m, C_H , C_Q , C_I , C_P'), 115,06 (s, C_C), 119,69, 120,22 (2s, C_K' , C_O' , C_K , C_M), 122,41 (m, C_B , C_0^2 , C_1^2 , C_2^2 , C_3^2), 124,39, 124,76, 124,99, 125,68 (m, C_L , C_0 , C_J , C_N , C_N'''' , C_I''), 127,74, 128,11 (m, C_N'' , C_I''' , C_I , C_P , C_0^3 , C_1^3 , C_2^3 , C_3^3), 132, 00 (sl, C_0^4 , C_1^4 , C_2^4 , C_3^4), 136,81, 137,07 (2s, $\underline{\text{CH}}=\text{N}-\text{NCH}_3\text{-P}_1$, $\underline{\text{CH}}=\text{N}-\text{NCH}_3\text{-P}_2$, $\underline{\text{CH}}=\text{N}-\text{NCH}_3\text{-P}_3$, $\underline{\text{CH}}=\text{N}-\text{NCH}_3\text{-P}_4$), 139,82, 140,00 (2s, C_L' , C_N'), 144,00 (s, C_B'), 147,00 (s, C_H'), 147,73 (s, C_Q'), 151,35 (sl, C_0^1 , C_1^1 , C_2^1 , C_3^1 , C_K'' , C_O), 156,07 (C_C') ppm.

Composé 45



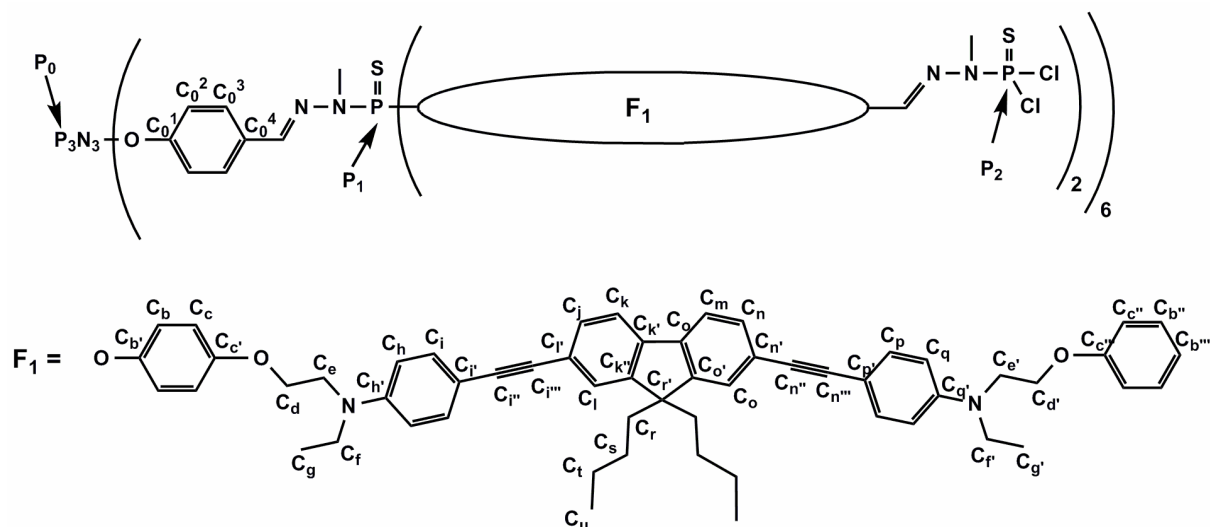
A une solution de dendrimère de 1^{ère} génération **G1** (16 mg, 8,76 mol) et de fluorophore **44** (89,2 mg, 105 mol) dans le THF distillé (3 mL), a été ajouté le carbonate de césium (68,5 mg, 210,2 mol). Le mélange réactionnel a été agité à 35°C pendant 10 jours, centrifugé pour enlever le sel formé et le solvant évaporé. Le produit brut obtenu a été purifié par précipitation dans un mélange pentane/éther diéthylique (x 2) suivie de la chromatographie sur colonne de silice en utilisant acétone puis dichlorométhane/méthanol (9/1, v/v) comme éluant pour donner le dendrimère **45** sous forme de solide jaune (72 %).

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz) : = 8,66 (s, N_3P_3), 64,49 (s, P=S) ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz) : = 0,50 – 0,80 (m, 120H, $\text{C}_s\text{-H}$, $\text{C}_u\text{-H}$), 1,00 – 1,40 (m, 120H, $\text{C}_t\text{-H}$, $\text{C}_g\text{-H}$, $\text{C}_{g'}\text{-H}$), 2,00 (sl, 48H, $\text{C}_r\text{-H}$), 3,22 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9,6$ Hz, 18H, N-CH_3), 3,30 – 3,58 (m, 48H, $\text{C}_f\text{-H}$, $\text{C}_{f'}\text{-H}$), 3,66 (sl, 24H, $\text{C}_e\text{-H}$), 3,82 (sl, 24H, $\text{C}_{e'}\text{-H}$), 3,99 (sl, 24H, $\text{C}_d\text{-H}$), 4,23 (m, 24H, $\text{C}_{d'}\text{-H}$), 6,65 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 24H, $\text{C}_q\text{-H}$), 6,66 – 6,69 (m, 48H, $\text{C}_h\text{-H}$, $\text{C}_c\text{-H}$), 6,85 – 7,15 (m, 60H, $\text{C}_0^2\text{-H}$, $\text{C}_b\text{-H}$, $\text{C}_{c''}\text{-H}$), 7,35 – 7,55 (m, 102H, $\text{C}_i\text{-H}$, $\text{C}_p\text{-H}$, CH=N , $\text{C}_l\text{-H}$, $\text{C}_o\text{-H}$, $\text{C}_j\text{-H}$, $\text{C}_n\text{-H}$), 7,55 – 7,76 (m, 36H, $\text{C}_0^3\text{-H}$, $\text{C}_k\text{-H}$, $\text{C}_m\text{-H}$), 7,85 (d, 24H, $\text{C}_{b'''}\text{-H}$), 9,91 (s, 12H, CHO) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz) : = 12,2 (sl, C_g , $\text{C}_{g'}$), 13,88 (s, C_u), 23,10 (s, C_l), 25,91 (s, C_s), 33,12 (d, $^2J_{\text{CP}} = 11,8$ Hz, N-CH_3), 40,31 (s, C_r), 45,61, 45,77 (2s, C_f , $\text{C}_{f'}$), 49,43 (s, C_e , $\text{C}_{e'}$), 53,47 (s, $\text{C}_{r'}$), 65,74, 65,83 (2s, C_d , $\text{C}_{d'}$), 88,56, 88,63 (2s, $\text{C}_{n''}$, $\text{C}_{i''}$), 90,73, 90,95 (2s, $\text{C}_{i''}$, $\text{C}_{n''}$), 109,90, 110,24 (2s, C_i , C_p), 111,45, 111,53 (2s, C_h , C_q), 114,77 (s, C_c , $\text{C}_{c''}$), 119,80 (s, C_k , C_m), 121,48 (s, C_0^2), 122,33, 122,38 (2s, $\text{C}_{k'}$, $\text{C}_{o''}$, C_b), 125,57 (s, C_l , C_o), 128,29 (s, C_0^3), 130,20 (s, $\text{C}_{b''}$), 130,42, 130,50 (2s, C_j , C_n), 132,04, 132,37 (2s, $\text{C}_{b'''}$, C_0^4), 133,07 (s, C_i , C_p), 138,2 (s, CH=N), 140,12, 140,20 (2s, C_l , $\text{C}_{n'}$), 144,24, 144,33 (2s, $\text{C}_{b'}$), 147,25, 147,37 (2s, C_q , C_h), 150,97 (s, C_0^1 , $\text{C}_{k''}$, C_o'), 156,07 (s, C_c), 163,64 (s, $\text{C}_{c''}$), 190,77 (s, CHO) ppm.

Composé 46



A une solution de **45** (100 mg, 8,64 mol) dans le THF distillé (2 mL) à 0°C, ont été ajoutés 350 L de N-méthyldichlorophosphorhydrazide (0,24 M dans le CHCl₃, 155 mol) et le mélange réactionnel a été agité pendant 5 heures à température ambiante. Après évaporation du solvant, le résidu a été dilué dans un minimum de THF et précipité dans une grande quantité de mélange pentane/éther diéthylique (9/1, v/v, l'éther diéthylique n'est ajouté qu'après la formation des précipité et juste avant la filtration). Cette étape de précipitation a été répétée deux fois de plus pour obtenir le dendrimère **46** sous forme de solide jaune (rendement quantitatif).

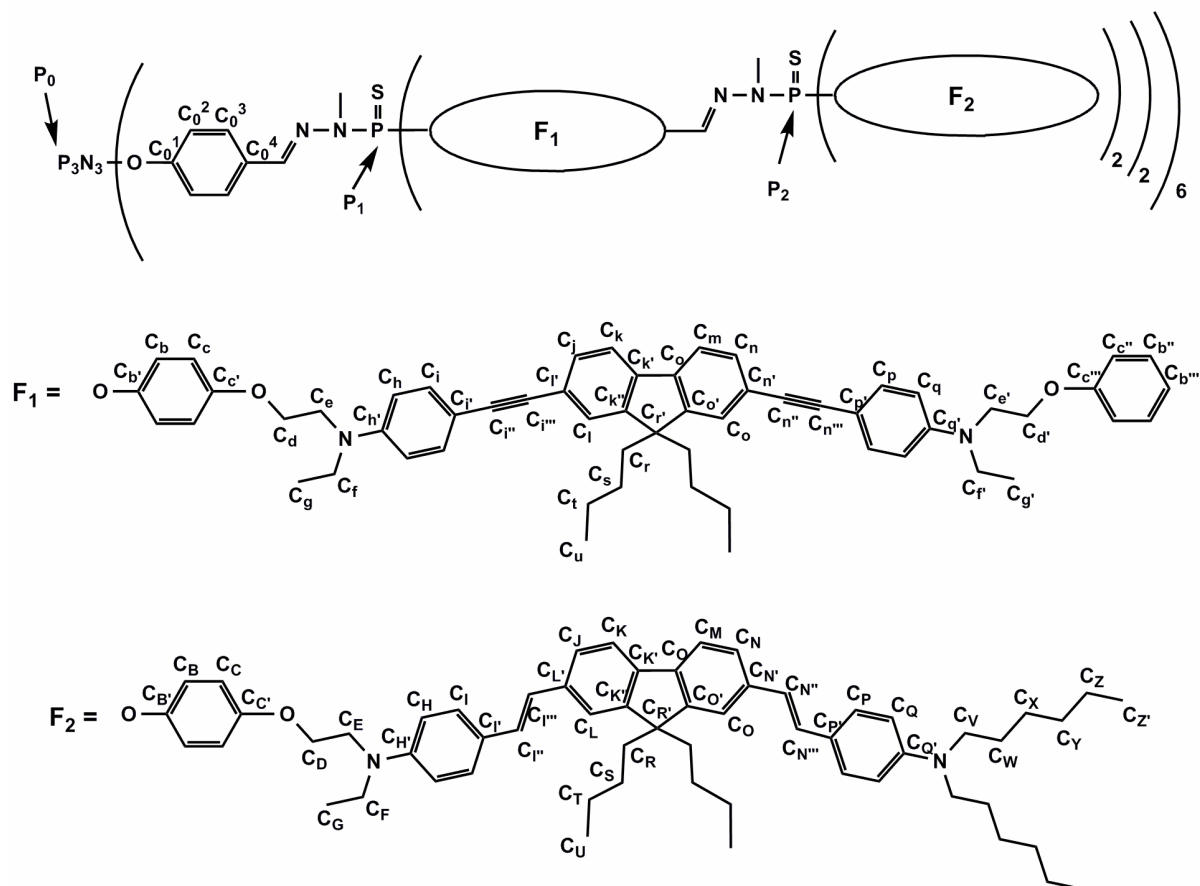
RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz) : = 8,65 (s, P_0), 63,30 (s, P_2), 64,49 (s, P_1) ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz) : = 0,50 – 0,85 (m, 120H, $\text{C}_s\text{-H}$, $\text{C}_u\text{-H}$), 1,00 – 1,40 (m, 120H, $\text{C}_t\text{-H}$, $\text{C}_g\text{-H}$, $\text{C}_g'\text{-H}$), 2,00 (sl, 48H, $\text{C}_r\text{-H}$), 3,10 – 3,35 (m, 54H, N-CH_3), 3,35 – 3,55 (m, 48H, $\text{C}_f\text{-H}$, $\text{C}_f'\text{-H}$), 3,70 (sl, 24H, $\text{C}_e\text{-H}$), 3,80 (sl, 24H, $\text{C}_e'\text{-H}$), 4,00 (sl, 24H, $\text{C}_d\text{-H}$) 4,18 (sl, 24H, $\text{C}_d'\text{-H}$), 6,64 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 24H, $\text{C}_q\text{-H}$), 6,66 – 6,69 (m, 48H, $\text{C}_h\text{-H}$, $\text{C}_c\text{-H}$), 6,85 – 7,16 (m, 60H, $\text{C}_0^2\text{-H}$, $\text{C}_b\text{-H}$, $\text{C}_c''\text{-H}$), 7,35 – 7,53 (m, 102H, $\text{C}_i\text{-H}$, $\text{C}_p\text{-H}$, CH=N , $\text{C}_l\text{-H}$, $\text{C}_o\text{-H}$, $\text{C}_j\text{-H}$, $\text{C}_n\text{-H}$), 7,55 – 7,80 (m, 60H, $\text{C}_0^3\text{-H}$, $\text{C}_k\text{-H}$, $\text{C}_m\text{-H}$, $\text{C}_b'''\text{-H}$) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz) : = 12,14 (sl, C_g , C_g'), 13,86, 13,90 (2s, C_u), 23,07 (s, C_l), 25,81 (s, C_s), 29,76 (s, N-CH $_3$), 31,89 (s, N-CH $_3$), 40,16 (s, C_r), 45,81 (sl, C_f , C_f'), 49,53 (s, C_e , C_e'), 55,17 (sl, C_r'), 65,45, 65,58 (2s, C_d , C_d'), 88,60 (sl, C_n' , C_i'''), 90,80 (2s,

$C_{i''}$, $C_{n''''}$), 110,00 (2s, $C_{i'}$, $C_{p'}$), 111,48 (sl, C_h , C_q), 114,76 (sl, C_c , $C_{c''}$), 119,53 (s, C_k , C_m), 121,40 (s, C_0^2), 122,35 (sl, $C_{k'}$, $C_{o''}$, C_b), 125,60 (s, C_l , C_o), 128,97 (s, C_0^3), 130,32 (2s, C_j , C_n , $C_{b''}$), 133,031 (sl, C_i , C_p , 2s, $C_{b''''}$, C_0^4), 140,14 (sl, $C_{i'}$, $C_{n'}$), 141,80 (sl, CH=N), 144,33 (s, $C_{b'}$), 147,23 (sl, $C_{q'}$, $C_{h'}$), 150,99 (s, C_0^1 , $C_{k''}$, $C_{o'}$), 156,00 (s, C_c'), 160,33 (s, $C_{c''''}$) ppm.

Composé 47 :



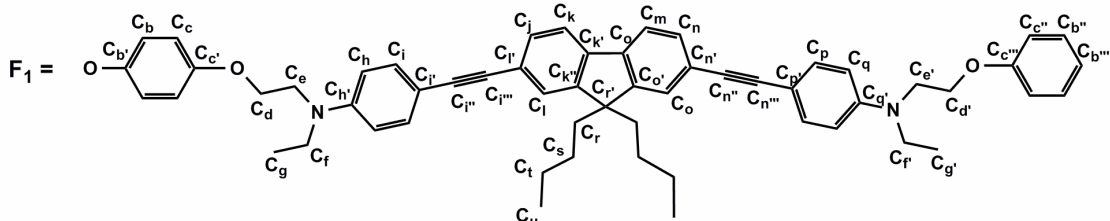
A une solution de **46** (11 mg, 0,814 mol) et de fluorophore **41** (16,9 mg, 19,95 mol) dans le mélange de THF/acétonitrile distillés (3 mL/1,5 mL), a été ajouté le carbonate de césium (13,3 mg, 40,7 mol) et le mélange réactionnel a été agité à 50°C pendant 2 jours. Après centrifugation pour enlever le sel formé et évaporation du solvant, le produit brut est solubilisé dans un minimum de THF et précipité dans une grande quantité de mélange pentane/éther diéthylique (9/1, v/v, l'éther diéthylique n'est ajouté qu'après la formation des précipité et juste avant la filtration). L'opération est répétée trois fois de plus puis le brut est purifié par chromatographie sur colonne d'exclusion stérique pour donner le dendrimer **47** sous forme de solide jaune (45 %).

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz) : = 8,60 (s, P_0), 64,69 (s, P_1 , P_2) ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz) : = 0,50 – 0,80 (m, 360H, $\text{C}_s\text{-H}$, $\text{C}_u\text{-H}$, $\text{C}_S\text{-H}$, $\text{C}_U\text{-H}$), 0,91 (m, 144H, $\text{C}_Z\text{-H}$), 1,00 – 1,40 (m, 576H, $\text{C}_t\text{-H}$, $\text{C}_g\text{-H}$, $\text{C}_{g'}\text{-H}$, $\text{C}_T\text{-H}$, $\text{C}_G\text{-H}$, $\text{C}_X\text{-H}$, $\text{C}_Y\text{-H}$, $\text{C}_Z\text{-H}$), 1,61 (sl, 96H, $\text{C}_W\text{-H}$), 2,00 (m, 144H, $\text{C}_r\text{-H}$, $\text{C}_R\text{-H}$), 3,10 – 3,35 (m, 54H, $\text{P}_1\text{-N-CH}_3$, $\text{P}_2\text{-N-CH}_3$), 3,35 – 3,55 (m, 192H, $\text{C}_f\text{-H}$, $\text{C}_F\text{-H}$, $\text{C}_V\text{-H}$, $\text{C}_F\text{-H}$), 3,55 – 3,78 (m, 96H, $\text{C}_e\text{-H}$, $\text{C}_{e'}\text{-H}$, $\text{C}_E\text{-H}$), 3,80 – 4,20 (m, 96H, $\text{C}_d\text{-H}$, $\text{C}_{d'}\text{-H}$, $\text{C}_D\text{-H}$), 6,64 – 6,80 (m, 216H, $\text{C}_q\text{-H}$, $\text{C}_h\text{-H}$, $\text{C}_c\text{-H}$, $\text{C}_Q\text{-H}$, $\text{C}_H\text{-H}$, $\text{C}_C\text{-H}$), 6,80 – 7,16 (m, 204H, $\text{C}_0^2\text{-H}$, $\text{C}_b\text{-H}$, $\text{C}_{c''}\text{-H}$, $\text{C}_B\text{-H}$, $\text{C}_I'\text{-H}$, $\text{C}_I'''\text{-H}$, $\text{C}_N'''\text{-H}$, $\text{C}_N''''\text{-H}$), 7,35 – 7,53 (m, 294H, 102H, $\text{C}_i\text{-H}$, $\text{C}_p\text{-H}$, $\text{C}_l\text{-H}$, $\text{C}_o\text{-H}$, $\text{C}_j\text{-H}$, $\text{C}_n\text{-H}$, $\text{C}_l\text{-H}$, $\text{C}_P\text{-H}$, $\text{C}_L\text{-H}$, $\text{C}_O\text{-H}$, $\text{C}_J\text{-H}$, $\text{C}_N\text{-H}$, $\text{CH=N-NCH}_3\text{-P}_1$, $\text{CH=N-NCH}_3\text{-P}_2$), 7,55 – 7,80 (m, 108H, $\text{C}_0^3\text{-H}$, $\text{C}_k\text{-H}$, $\text{C}_m\text{-H}$, $\text{C}_{b''}\text{-H}$, $\text{C}_l^3\text{-H}$, $\text{C}_K\text{-H}$, $\text{C}_M\text{-H}$) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz) : = 12,25 (s, C_g , $\text{C}_{g'}$), 12,38 (s, C_G), 13,84, 14,06 (2s, C_u , C_U , C_Z'), 22,69 (s, C_Z), 23,14 (s, C_t , C_T), 25,97 (s, C_s , C_S), 26,85 (s, C_X), 27,31 (s, C_W), 29,15, 29,32, 29,71 (m, $\text{P}_2\text{-N-CH}_3$), 31,74 (s, C_Y), 33,15 (s, $\text{P}_1\text{-N-CH}_3$), 40,45 (s, C_r , C_R), 45,71 (sl, C_f , C_F , C_F), 49,66 (sl, C_e , $\text{C}_{e'}$, C_E), 51,09 (s, C_V), 54,78 (s, $\text{C}_{R'}$), 55,05 (s, C_r'), 65,81 (sl, C_d , $\text{C}_{d'}$, C_D), 111,44, 111,67, 111,86 (m, C_i' , C_p' , C_h , C_q , C_H , C_Q , C_I' , C_P'), 114,69 (sl, C_c , $\text{C}_{c''}$), 115,00 (s, C_C), 119,60, 120,19 (2s, C_k , C_m , $\text{C}_{K'}$, C_O' , C_K , C_M), 122,51 (sl, C_B , C_0^2 , $\text{C}_{k'}$, $\text{C}_{o''}$, C_b), 125,00, 125,53, 125,72 (m, C_l , C_o , C_L , C_O , C_J , C_N , C_N'''' , C_I''), 127,70, 127,79, 128,09, 128,49 (m, C_0^3 , C_j , C_n , $\text{C}_{b''}$, C_N'' , C_I''' , C_l , C_P), 133,02 (s, C_i , C_p , $\text{C}_{b''''}$, C_0^4), 136,82, 137,08 (2s, $\text{CH=N-NCH}_3\text{-P}_1$, $\text{CH=N-NCH}_3\text{-P}_2$), 140,04 (m, C_l' , C_n' , C_L' , C_N'), 144,43 (s, C_b' , $\text{C}_{B'}$), 147,05, 147,34 (m, C_H' , C_q' , C_h' , C_Q'), 150,95, 151,36 (2s, $\text{C}_{k''}$, C_O' , C_0^1 , $\text{C}_{K''}$, C_O'), 156,04 (s, $\text{C}_{c'}$, $\text{C}_{C'}$), 160,33 (s, $\text{C}_{c''''}$) ppm. Les signaux correspondant aux C_n'' , C_i''' , C_l''' et C_n'''' ne sont pas observés.

Composé 48 :



A une solution de dendrimère **46** (25 mg, 1,85 mol) et de PEG phénol **39** (57 mg, 66,6 mol) dans le THF distillé (3 mL), a été ajouté le carbonate de césium (28 mg, 44,4 mol). Le mélange réactionnel est laissé agiter à température ambiante pendant 4 heures avant d'être centrifugé et évaporé. Le produit brut a été purifié par précipitation dans l'éther diéthylique puis par chromatographie sur colonne d'exclusion stérique pour donner le dendrimère **48** sous forme d' solide jaune (49 %).

RMN $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 121,5 MHz): =, 8,61 (s, P_3N_3), 64,67 (s, $\text{P}=\text{S}$) ppm.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300,1 MHz) : = 0,50 – 0,85 (m, 120H, $\text{C}_s\text{-H}$, $\text{C}_u\text{-H}$), 1,00 – 1,40 (m, 120H, $\text{C}_t\text{-H}$, $\text{C}_g\text{-H}$, $\text{C}_{g'}\text{-H}$), 2,00 (sl, 48H, $\text{C}_r\text{-H}$), 3,10 – 3,35 (m, 54H, N-CH_3), 3,35 – 3,55 (m, 84H, $\text{C}_f\text{-H}$, $\text{C}_{f'}\text{-H}$, $\underline{\text{CH}_2\text{-O-CH}_2}$), 3,55 – 3,90 (m, $\sim 1584\text{H}$, $\text{C}_e\text{-H}$, 24H, $\text{C}_{e'}\text{-H}$, CH_2), 3,98 (sl, 24H, $\text{C}_d\text{-H}$), 4,08 (t, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 5,0$ Hz, 48H, $\text{CH}_2\text{-O-C}_p^{\text{P}}$), 4,19 (sl, 24H, $\text{C}_d'\text{-H}$), 6,56 – 6,76 (m, 72H, $\text{C}_q\text{-H}$, $\text{C}_h\text{-H}$, $\text{C}_c\text{-H}$), 6,84 (d, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 8,4$ Hz, 48H, $\text{C}_o^{\text{P}}\text{-H}$), 6,86 – 7,25 (m, 120H, $\text{C}_0^2\text{-H}$, $\text{C}_b\text{-H}$, $\text{C}_{c'}\text{-H}$, $\text{C}_0^2\text{-H}$, $\text{C}_m^{\text{P}}\text{-H}$), 7,26 – 7,80 (m, 162H, CH=N , $\text{C}_i\text{-H}$, $\text{C}_p\text{-H}$, $\text{C}_l\text{-H}$, $\text{C}_o\text{-H}$, $\text{C}_j\text{-H}$, $\text{C}_n\text{-H}$, $\text{C}_0^3\text{-H}$, $\text{C}_k\text{-H}$, $\text{C}_m\text{-H}$, $\text{C}_{b'}\text{-H}$) ppm.

RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz) : = 12,26 (sl, C_g , C_g'), 13,86 (s, C_u), 23,20 (s, C_l), 26,16 (s, C_s), 29,65 (s, N-CH $_3$), 33,30 (s, N-CH $_3$), 40,28 (s, C_r), 45,86 (sl, C_f , C_f'), 49,54 (s, C_e , C_e'), 53,54 (sl, C_r'), 59,02 (s, $\underline{\text{CH}_3\text{-O-CH}_2}$), 65,91 (s, C_d , C_d'), 67,86 (s, $\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{CH}_2\text{-O-C}_p^{\text{P}}}$), 69,68 (s, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-C}_p^{\text{P}}}$), 70,55 (m, $\text{CH}_2(\text{PEG})$), 88,60 (sl, C_n'' , C_i'''), 90,80 (2s, C_i'' , C_n'''),

110,00, 111,41 (2s, C_i¹, C_p¹, C_h, C_q), 114,90, 115,13 (m, C_c, C_c¹, C_o^p), 119,74 (s, C_k, C_m), 122,39 (sl, C_o², C_k¹, C_o¹, C_b, C_m^p), 125,50 (s, C_l, C_o), 128,32 (s, C_o³), 130,59 (s, C_j, C_n, C_b¹), 133,01 (sl, C_i, C_p, 2s, C_b¹, C_o⁴), 138,92, 140,43 (sl, C_l, C_n), 144,36 (sl, CH=N, C_i^p, C_b¹), 147,33 (sl, C_q, C_h), 151.06 (s, C_o¹, C_k¹, C_o¹), 156.01 (s, C_c, C_o¹, C_p^p), 159,68 (s, C_c¹) ppm.

Conclusion

L'objectif de cette thèse consistait à synthétiser de nouveaux dendrimères fluorescents solubles dans l'eau pour l'imagerie par fluorescence des événements cellulaires et moléculaires en biologie. Dans un premier temps, pour éviter les problèmes de photo-dommage et d'auto-fluorescence, nous avons développé notre propre fluorophore qui émet dans la région proche-infrarouge, un dérivé de pérylène diimide possédant un groupement phénol pour son greffage sur le dendrimère. Afin d'introduire un point d'ancrage sur le dendrimère pour son couplage à un anticorps spécifique, nous avons utilisé la méthodologie du système AB₅ et greffé directement au cœur un bras-espaceur dont la fonction carboxylique est protégée. Après la croissance dendritique jusqu'à la 1^{ère} génération et le greffage des motifs pérylène, la fonction carboxylique est libérée et permet ainsi le couplage du dendrimère-pérylène à un anticorps. Malheureusement ce dendrimère n'est quasiment pas fluorescent à cause des interactions "π-stacking" entre les motifs pérylène. Néanmoins, il constitue tout de même un modèle complet pour réaliser le ciblage et l'imagerie des cellules cancéreuses *in vivo* par fluorescence. En effet, La synthèse de ce dendrimère possédant 10 motifs pérylène incorporant un bras-espaceur et l'étude préliminaire de son couplage à l'ASB et l'anticorps anti-trp75 ont permis, malgré la perte de fluorescence, de valider le concept de l'outil fluorescent "intelligent" à base de dendrimère phosphoré pour l'imagerie *in vivo*.

Le chapitre III est consacré à la synthèse et à l'utilisation des dendrimères phosphorés polycationiques pour la transfection. Tout d'abord, afin d'améliorer la solubilité dans l'eau des dendrimères phosphorés polycationiques en augmentant le nombre de charges pour une meilleure performance en transfection, il a été envisagé de greffer des molécules de spermine à la surface du dendrimère. Pour ce faire, la spermine qui possède 2 amines primaires et 2 amines secondaires de manière symétrique a subi plusieurs étapes de protection/déprotection afin de posséder uniquement une amine primaire libre pour son greffage sur le dendrimère.

Néanmoins, le greffage n'a pas pu être effectué de manière complète car la prolongation de la réaction de substitution nucléophile en vue d'un greffage complet provoque la dégradation du dendrimère. Afin de visualiser par fluorescence les événements cellulaires durant la transfection, nous avons synthétisé un outil dendritique possédant un fluorophore maléimide directement lié au cœur et des charges positives à la surface pour la solubilité dans l'eau et pour l'interaction avec l'ADN selon une méthode plus classique. Les mesures photophysiques de ce dendrimère ont montré une intensité de fluorescence insuffisante, cependant les études biologiques préliminaires semblent indiquer une tolérance relativement bonne par des cellules testées. De plus, les mesures effectuées par la technique de dichroïsme circulaire et par électrophorèse ont permis de confirmer l'interaction de ce dendrimère avec l'ADN et par conséquent la formation du dendriplexe. Il serait donc intéressant de remplacer le dérivé de maléimide par un fluorophore plus compatible et de construire un dendrimère de plus haute génération afin d'améliorer l'efficacité de transfection ainsi que le contrôle visuel.

Dans le but d'améliorer la solubilité dans l'eau et la biocompatibilité du dendrimère phosphoré, nous avons mis au point la synthèse d'un dendrimère possédant des chaînes de polyéthylène glycol à la surface. La variation du rayon hydrodynamique de ce dendrimère en fonction du solvant a été mesurée par la technique de diffusion en RMN (DOSY) et ces expériences ont montré que le dendrimère-PEG présente une conformation presque 2 fois plus étendue dans l'eau que dans un solvant peu polaire tel que le chloroforme. Les tests de cytotoxicité effectués sur deux lignées cellulaires semblent indiquer l'absence d'effet toxique de ce dendrimère PEG, ce qui rend cette méthode de fonctionnalisation du dendrimère par le PEG particulièrement prometteuse pour les applications biologiques.

Nous sommes presque toujours confrontés au problème de fluorescence de nos dendrimères synthétisés au cours de cette thèse, ce point limitant pourrait être résolu par incorporation des fluorophores à absorption biphotonique dans la structure dendritique. Le chapitre V a été dédiée à cette partie du travail. Deux dendrimères phosphorés de 2^{ème} et de 4^{ème} générations possédant respectivement 24 et 96 fluorophores à absorption biphotonique à la surface et un dendrimère ayant deux types de fluorophores respectivement dans les branches et à la surface ont été synthétisés afin d'étudier l'influence de la génération sur les

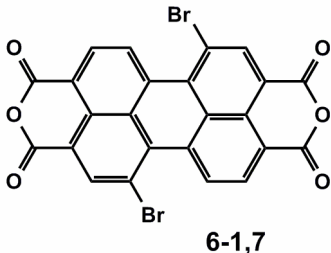
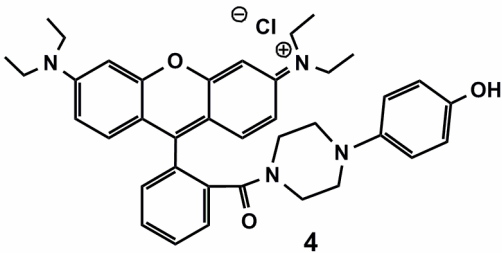
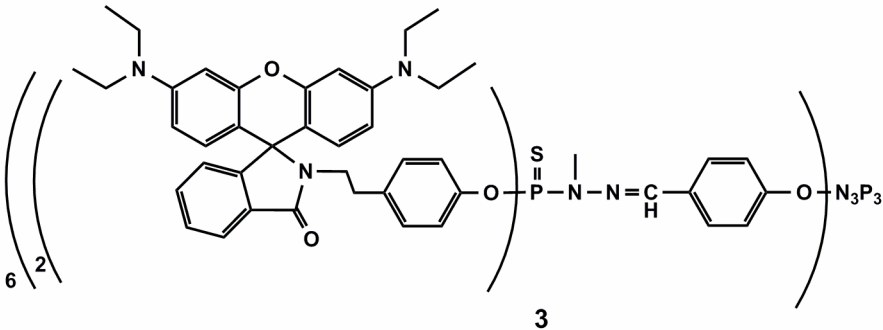
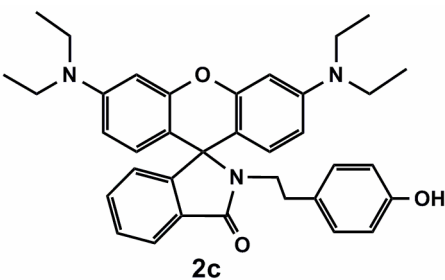
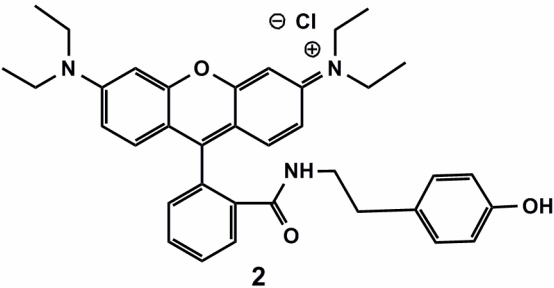
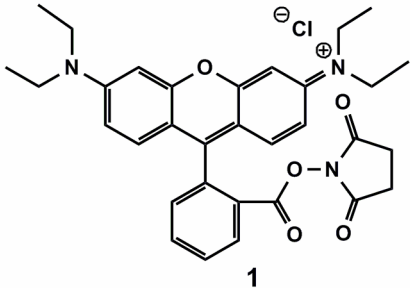
propriétés photoluminescentes des nanodots organiques ainsi que le transfert d'énergie entre les fluorophores incorporés dans la structure dendritique.

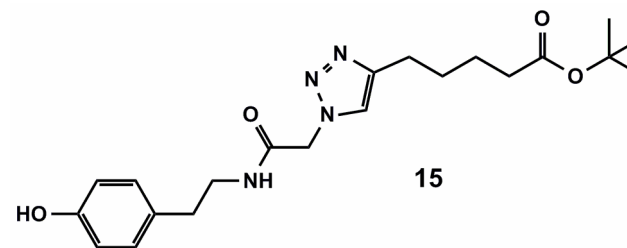
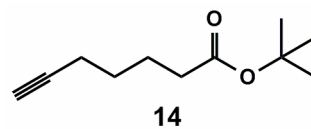
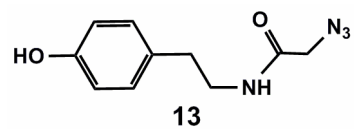
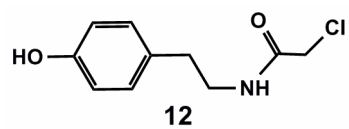
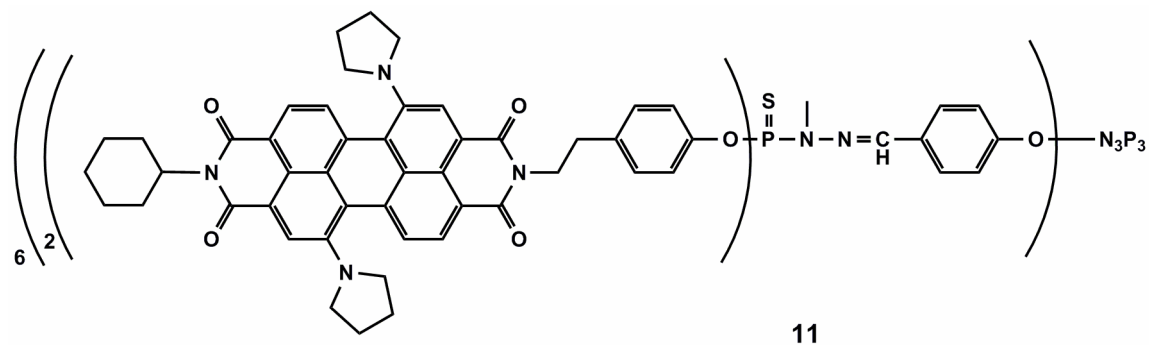
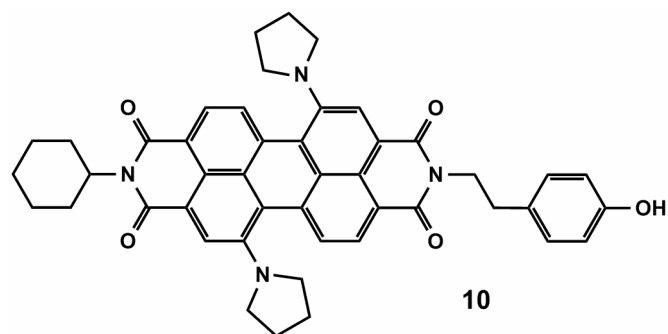
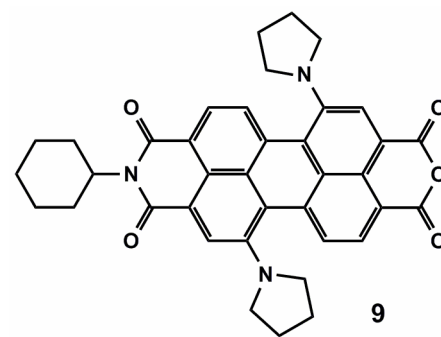
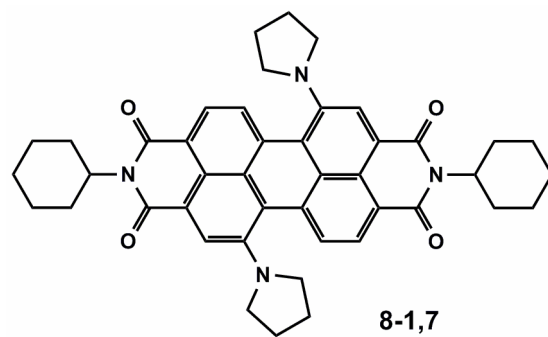
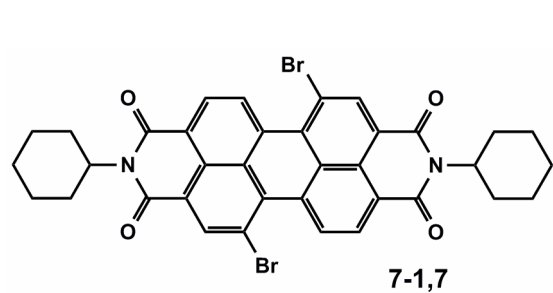
Enfin, un dendrimère à absorption biphotonique soluble dans l'eau a été obtenu par greffage des chaînes de PEG sur un dendrimère incorporant des fluorophores dans les branches. Ce nouveau dendrimère n'est pas toxique pour les cellules testées, et est particulièrement intéressant du fait de ses comportements optiques dans l'eau. La formation de clusters de fluorescence dans les zones irradiées en microscopie à absorption biphotonique est probablement due à l'effet thermique du laser, mais des expériences de caractérisation supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre ce phénomène.

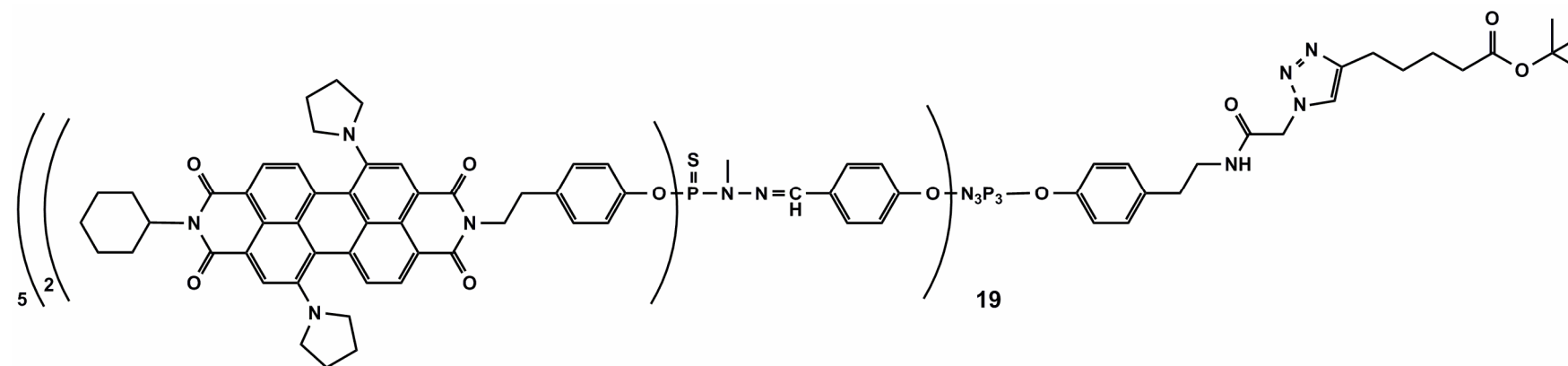
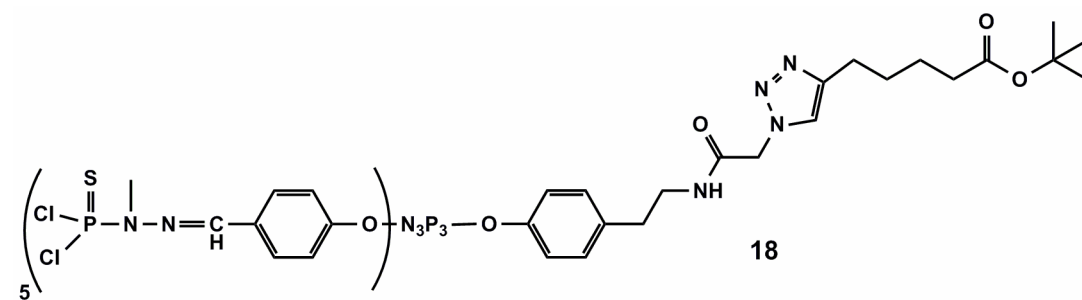
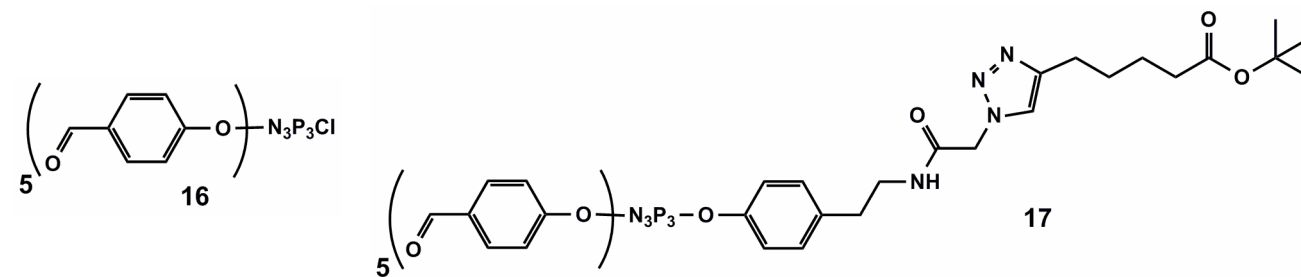
L'hydrosolubilité et la biocompatibilité de ce dendrimère pourraient être améliorées par simple greffage de plus longues chaînes de PEG selon le même schéma de synthèse. Un bras-espaceur pour l'accrochage d'une entité de reconnaissance pourrait éventuellement être incorporé en utilisant le système AB₅ pour cibler un certain type cellulaire. L'obtention de ce dernier dendrimère fluorescent et hydrosoluble après de nombreux efforts dans ce sens au cours de ces trois dernières années de thèse marque clairement une étape importante dans la conception et la construction des nouvelles sondes fluorescentes pour l'imagerie *in vivo* ciblée. Ce nouvel outil à base de dendrimère phosphoré pourrait potentiellement constituer, à l'avenir, un agent de contraste en imagerie médicale à fluorescence pour le diagnostic et la localisation des cellules cancéreuses.

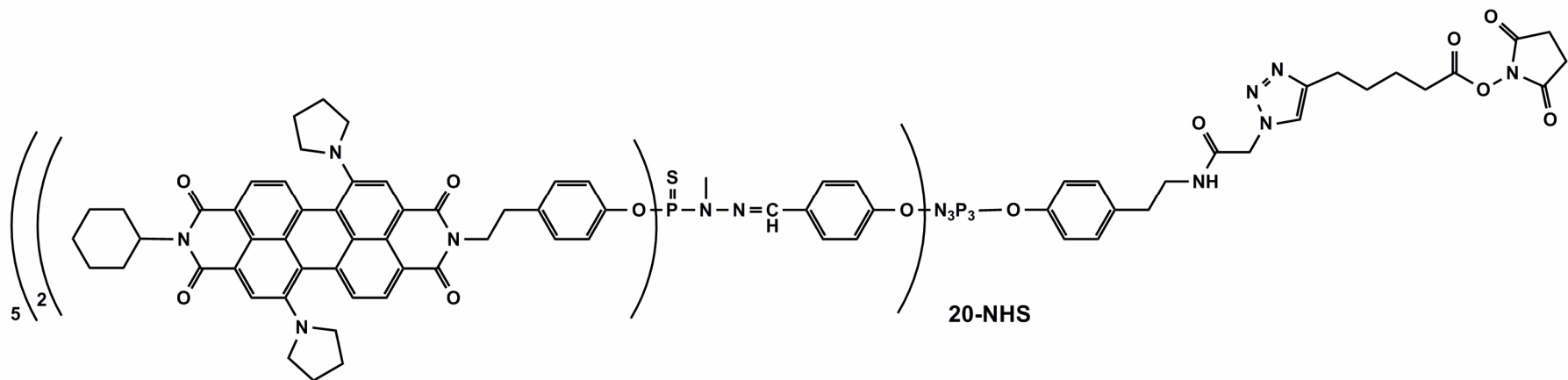
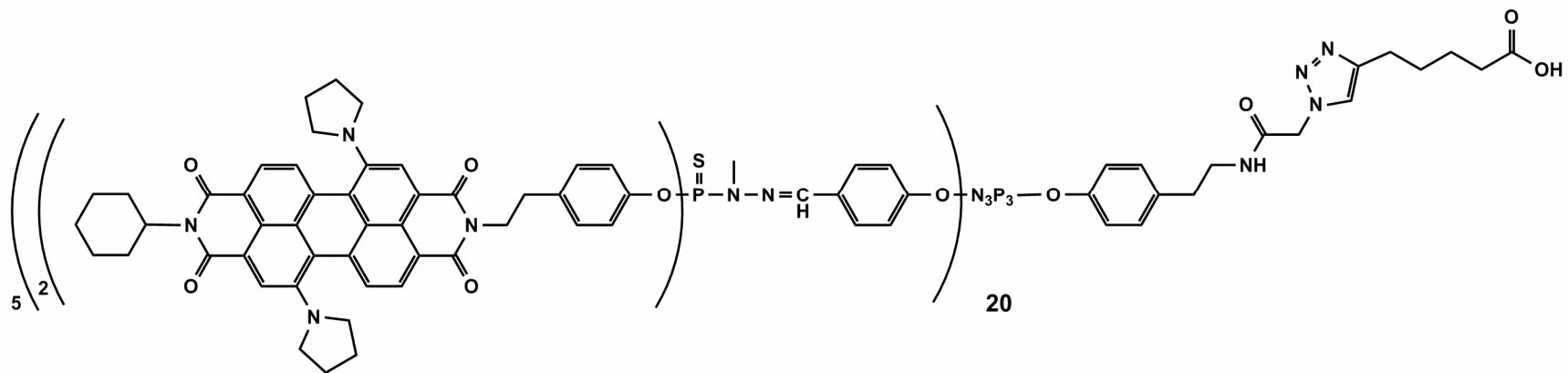
Liste des produits synthétisés

Chapitre II

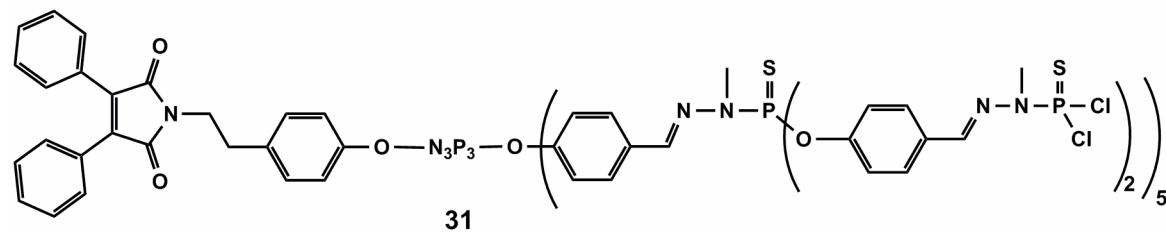
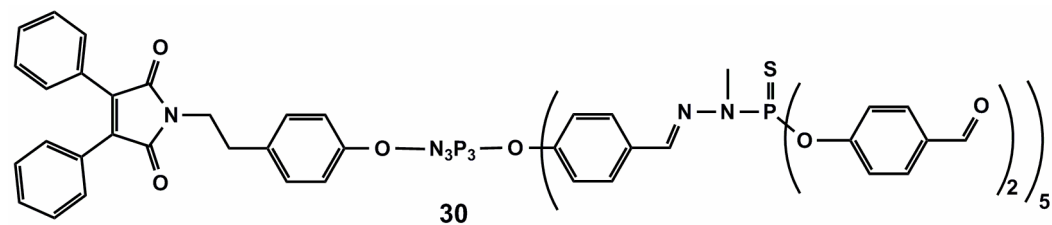
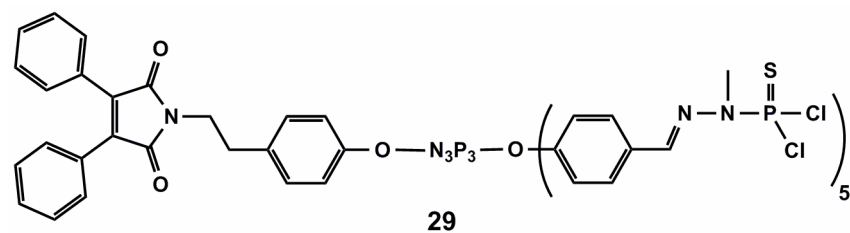
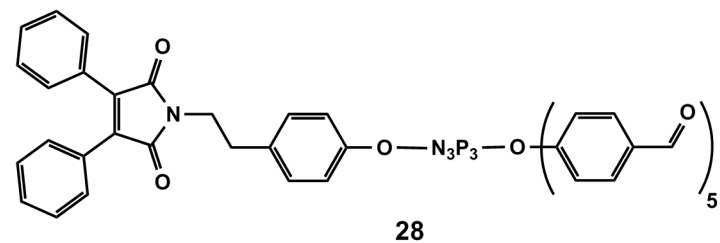
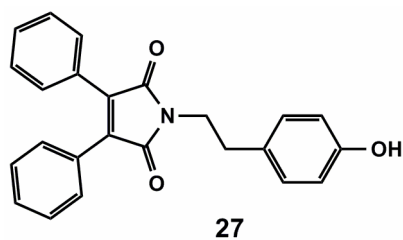
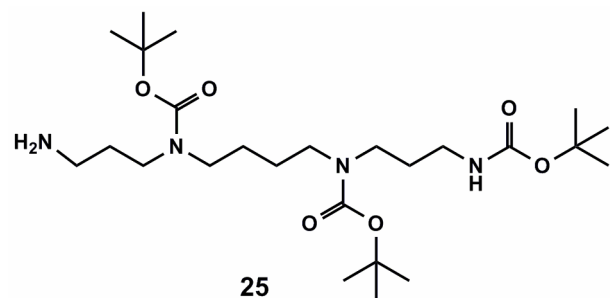


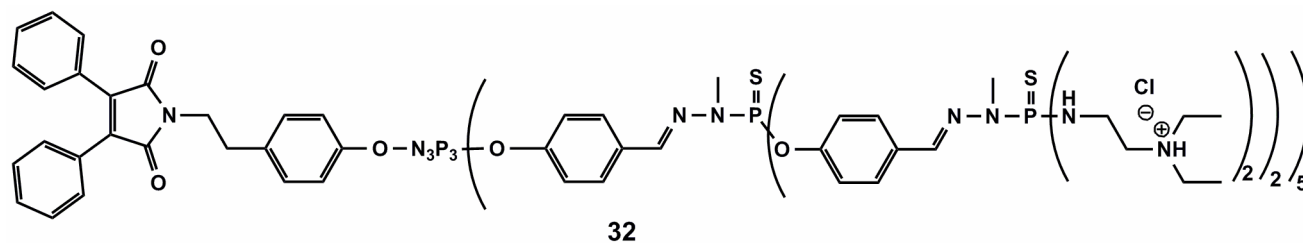




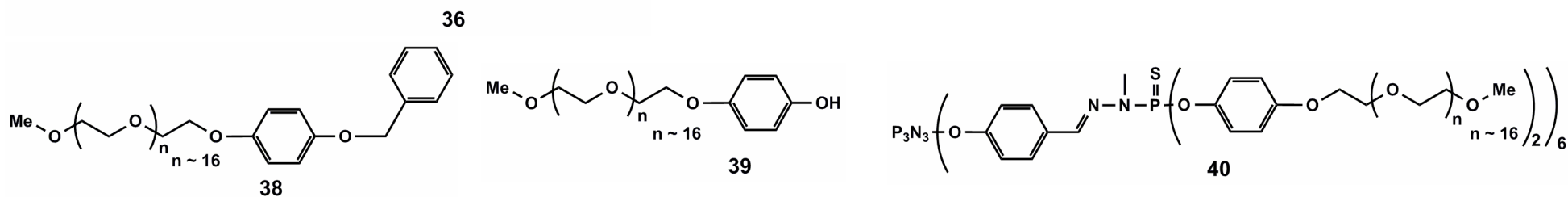
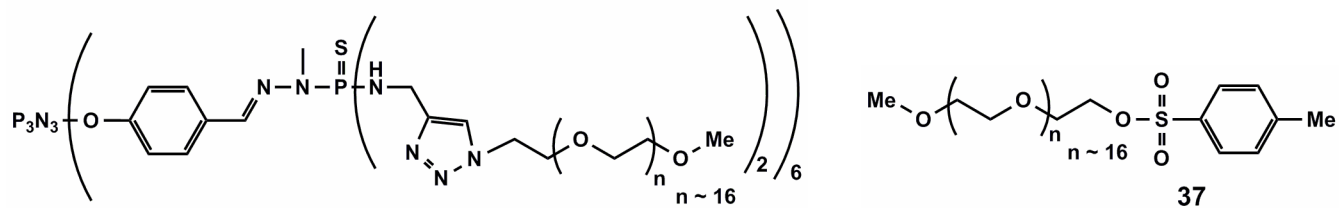
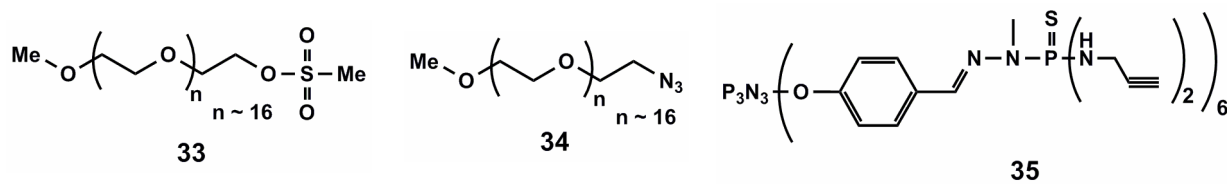


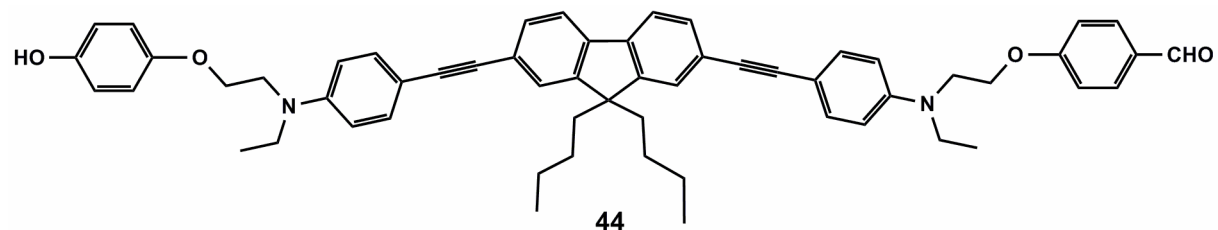
Chapitre III



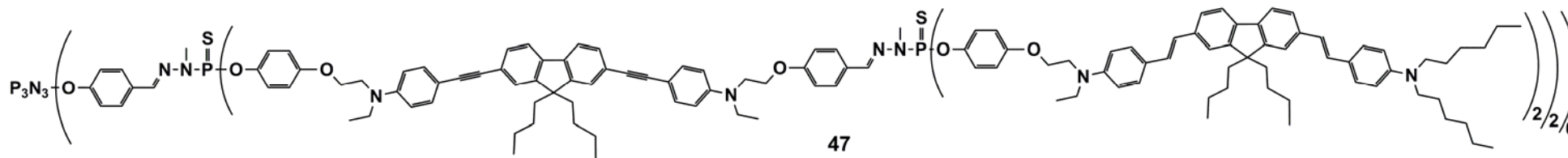
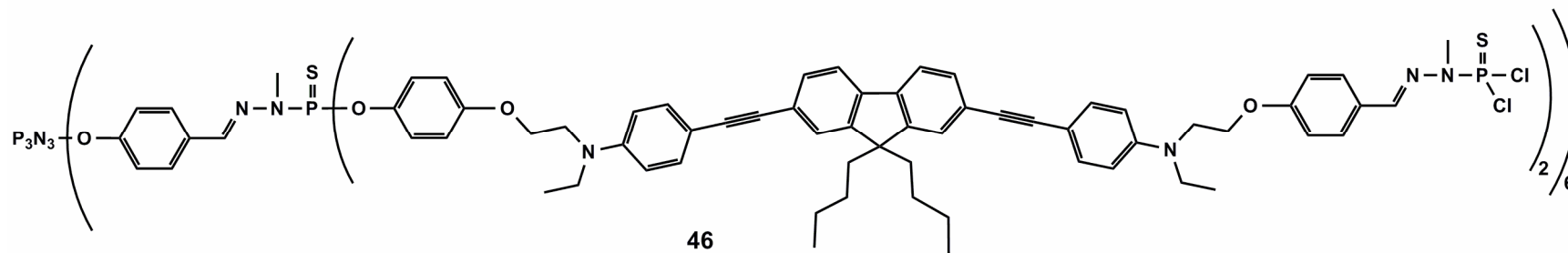
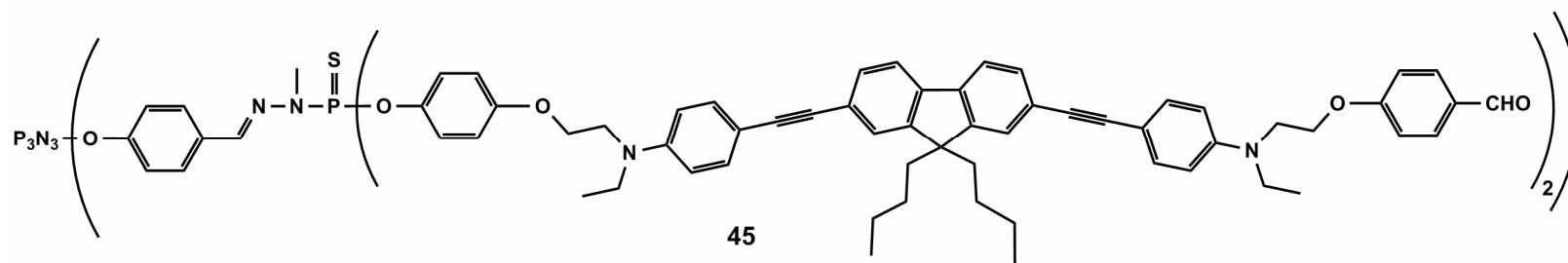


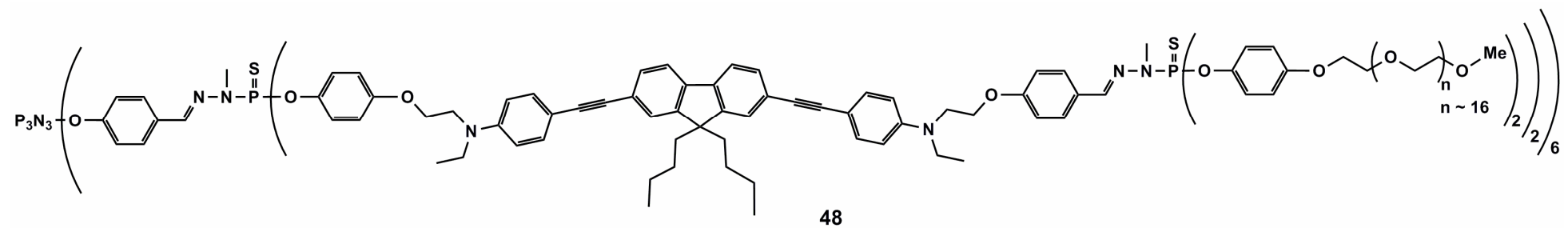
Chapitre IV





synthétisé par le Laboratoire de Synthèse et
Electrosynthèse Organiques de l'Institut de Chimie
de l'Université de Rennes I





Abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Absorption à Deux Photons
ARN	Acide RiboNucléique
ASB	Albumine de Sérum Bovin
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CD	Dichroïsme Circulaire
DCC	N,N'-DiCyclohexylCarbodiimide
DIPC	DiIsoPropylCarbodiimide
DMAP	4-DiMéthylAminoPyridine
DMF	DiMéthylFormamide
DMSO	DiMéthylSulfoxyde
DOSY	<i>Diffusion Ordered Spectroscopy</i>
dUTP	désoxyUridine TriPhosphate
FCS	<i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluorecéine IsoThioCyanate
FRET	<i>Frörster Resonance Energy Transfer</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
ICG	<i>IndoCyanine Green</i>
IPBS	Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight</i>
MDCK	<i>Mardin-Darby Canine Kidney cells</i>
MTT	Bromure de 3-[4-5-méthylthiaz-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium
MTX	MéthoTreXate
NHS	N-HydroxySuccinimide
NK	<i>Natural Killer</i>
NLO	<i>NonLinear Optics</i>
NMP	N-MéthylePyrrolidinone
OEG	OligoEthylène Glycol
PAMAM	PolyAMidoAMine
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCD	Polarisation Circulaire Droite
PCG	Polarisation Circulaire Gauche
PE	PhycoErythrine
PEG	Polyéthylène glycol
PEG	PolyEthylène Glycol
PEO	PolyEthylène Oxyde

PL	PhotoLuminescence
PPI	Poly(PropylèneImine)
QD	Quantum Dot
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SM	Spectrométrie de Masse
SVF	Sérum du Veau Fœtal
TFA	<i>TriFluoroacetic Acid</i>
THF	TétraHydroFurane
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMS	TétraMéthylSilance
TPA	<i>Two-Photon Absorption</i>
TPA	<i>Two-Photon Absorption</i>
TPEF	<i>Two-Photon Excited Fluorescence</i>
TPEF	<i>Two-Photon-Excited Fluorescence</i>
TRP	<i>Tyrosinase Related-Protein</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial growth Factor</i>

AUTEUR : Yiqian WEI

TITRE : Design de dendrimères fluorescents pour l'imagerie

DIRECTEURS DE THESE : Jean-Pierre MAJORAL, Anne-Marie CAMINADE

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Laboratoire de Chimie de Coordination

Toulouse le 21 septembre 2009

Les dendrimères sont des macromolécules hyperramifiées constituées de monomères associés selon un processus arborescent autour d'un cœur central plurifonctionnel. Dans cette thèse, nous avons d'abord cherché à construire un dendrimère fluorescent dans le proche-infrarouge pour l'imagerie *in vivo* non invasive. Puis, nous avons développé un dendrimère fluorescent polycationique dans le but de « visualiser » le transfert d'ADN. Ensuite, nous avons synthétisé et caractérisé un dendrimère hydrosoluble possédant des chaînes de PEG en surface. Plusieurs dendrimères phosphorés incorporant des fluorophores à absorption biphotonique, appelés "nanodots organiques", ont également été obtenus dont un nanodot hydrosoluble biocompatible qui pourrait potentiellement constituer un agent de contraste pour l'imagerie par fluorescence du fait de sa biocompatibilité et de ses propriétés physiques surprenantes.

Mots-Clés : Dendrimère, polymères, fluorescence, imagerie biologique, proche-infrarouge, transfection, polyéthylène glycol, hydrosolubilité, absorption à deux photons

Ecole doctorale sciences de la matière – Chimie macromoléculaire et supramoléculaire

Laboratoire de Chimie de Coordination

205, Route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex 4